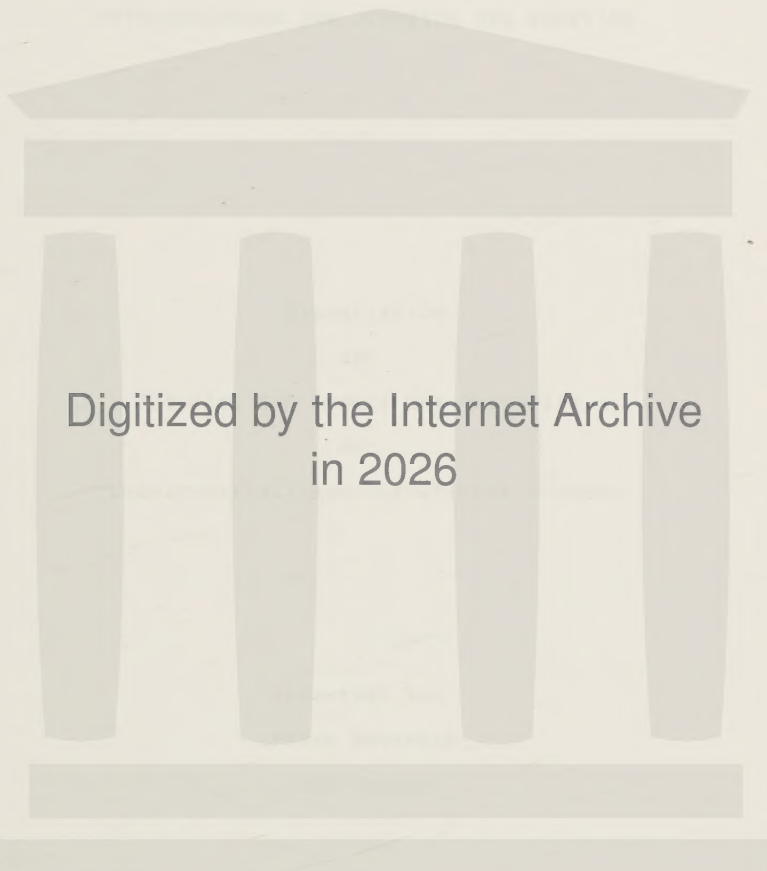


HALORHODOPSIN,
DIE LICHTGETRIEBENE
CHLORIDPUMPE
IN HALOBACTERIUM HALOBIUM
Untersuchungen zur Struktur und Funktion

Peter Hegemann

*Dass
München
1984*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

HALORHODOPSIN, DIE LICHTGETRIEBENE CHLORIDPUMPE
IN HALOBACTERIUM HALOBIVM
UNTERSUCHUNGEN ZUR STRUKTUR UND FUNKTION

Dissertation
der
Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Peter Hegemann
aus Aachen

München, 1984

1. Berichterstatter: Prof. Dr. D. Oesterhelt

2. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung: 24. Juli 1984

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

die Sinne trügen nicht
das Urteil trügt

J.W.G.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von März 1981 bis Dezember 1983 auf Anregung und unter Leitung von Herrn Prof.D.Oesterheit am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried erstellt. Die Versuche an schwarzen Membranen wurden zusammen mit Dr. Ernst Bamberg am Max-Planck-Institut für Biophysik in Frankfurt durchgeführt.

DANKSAGUNGEN

Herrn Prof. Dr. Oesterhelt danke ich für die gute Betreuung und Förderung dieser Arbeit

Weiterhin möchte ich mich bedanken

bei Frau Irmtraud Dunger für die Durchführung der Aminosäureanalysen

bei Herrn Dr. Lottspeich für die Sequenzierung der BrCN-Peptide

bei Herrn Dr. Ernst Bamberg für die freundliche Aufnahme und gute Zusammenarbeit im Frankfurter Institut.

bei Herrn Dr. Jürgen Vogel für die Hilfe bei der Blitzlichtphotolyse

bei Michael Steiner für die zahlreichen anregenden Diskussionen

und ganz besonders bei meiner Frau Utah für ihre technische Unterstützung im letzten Jahr.

1.	ZUSAMMENFASSUNG	5
2.	EINLEITUNG	8
2.1	Bakteriorhodopsin	8
2.2	Halorhodopsin	12
2.3	Slow Rhodopsin	17
3.	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	19
3.1	Halorhodopsinisolierung	21
3.1.1	Isolierung von denaturiertem einbandigem Halorhodopsin	21
3.1.2	Isolierung von denaturiertem zweibandigem Halorhodopsin	28
3.1.3	Isolierung von nativem Halorhodopsin	31
3.1.4	Vergleich der verschiedenen Anreicherungsverfahren	32
3.2	Untersuchung zur Primärstruktur	34
3.2.1	Aminosäurezusammensetzung	34
3.2.2	Limitierte Proteolyse mit V8-Protease	36
3.2.3	Bromcyanspaltung und Isolierung der Peptide	38
3.2.4	Jodosobenzoessäurespaltung und Isolierung des Hauptfragments	45
3.2.5	Vergleich der verschiedenen Spaltungsmethoden	46
3.3	Der Halorhodopsinchromophor	48
3.3.1	Verhältnis der Retinalisomere	48
3.3.2	Hydroxylaminbleichung	54
3.3.3	Boranatreduktion	55
3.4	Antikörper gegen Halorhodopsin	59
3.5	Halorhodopsininduktion	63
3.5.1	Vergleich von ein- und zweibandigem Halorhodopsin	63
3.5.2	Einfluß von Retinal auf die Biosynthese des HR	70
3.6	Rekonstitution der Halorhodopsinaktivität an Schwarzen Lipidmembranen	72
3.6.1	Anlagerungen von Membranfraktionen	72
3.6.2	Anlagerung von Halorhodopsinvesikeln	87
3.7	Bestimmung der Quantenausbeute für die Bildung der 410 nm-Form des Halorhodopsins	99
3.8	Bestimmung von Geschwindigkeits- und	

	Gleichgewichtskonstanten für die HR ₁₀ -Bildung	104
3.9	Blitzlichtphotolyse	114
4.	DISKUSSION	121
5.	MATERIAL UND METHODEN	134
5.1	Bakterienzucht und Anreicherung von PM	134
5.2	Präparation von Vesikeln	135
5.3	Rekonstitution und Reduktion von HR in L-07 Vesikeln	136
5.4	Gesamtmembranfraktion	136
5.5	Denaturierte Isolierung von einbandigem HR	137
5.6	Denaturierte Isolierung von zweibandigem HR	139
5.7	Native Isolierung von HR	140
5.8	Aminosäureanalysen	140
5.9	Produktion von Antikörpern	141
5.10	Fluorographie	142
5.11	BrCN-Spaltung	142
5.12	Jodosobenzoessäurespaltung und Fraktionierung der Peptide	143
5.13	Limitierte Proteolyse mit V8-Protease	143
5.14	HPLC von BrCN-Peptiden	144
5.15	Extraktion der Retinalisomere aus der Bindungsstelle	145
5.16	Bildung, Extraktion und Auftrennung der Retinaloxime	145
5.17	Halorhodopsininduktion	146
5.18	Analytische Boranatreduktion von Membranfraktionen	146
5.19	Herstellung von schwarzen Lipidmembranen	147
5.20	Aktionsspektren der HR induzierten Photoströme	147
5.21	Herstellung von Halorhodopsin-Liposomen	148
5.22	Blitzlichtphotolyse	148

6. LITERATUR	150
7. ABKÜRZUNGEN	159

1. ZUSAMMENFASSUNG

Zu Beginn dieser Arbeit war bekannt, daß in *Halobacterium halobium* neben dem Bacteriorhodopsin (BR) ein weiteres retinalbindendes Protein existiert, das mit Hilfe von Lichtenergie andere Ionen als Protonen transportiert.

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zur Struktur und Funktion dieses neu entdeckten Chromoproteins, das heute Halorhodopsin (HR) genannt wird, durchgeführt und dabei folgende Ergebnisse erzielt:

1) Es wurde eine Methode zur Isolierung von Halorhodopsin (HR) aus Retinal-negativen Zellen entwickelt. In Retinal negativen Zellvesikeln wurde das Apoprotein mit radioaktivem Retinal zum Chromoprotein rekonstituiert und dieses mit Boranat reduziert. Die durch Dialyse und Zentrifugation erhaltene Gesamtmembranfraktion wurde in 4 % SDS gelöst und das Retinylprotein durch Gelfiltration, Hydroxylapatit-chromatographie und präparative Gelelektrophorese gereinigt. Das Endprodukt wandert als scharfe Einzelbande mit einem app. Molekulargewicht von 20 KD auf dem SDS-Gel.

Zweibandiges HR mit app. Molekulargewichten von 19 und 20 KD wurde aus Retinal-positiven Zellen nach Waschen der Gesamtmembranfraktion mit Tween 20 und Auflösen der Gesamtmembranfraktion in 4 % SDS allein durch Gelfiltration isoliert.

2) Durch Aminosäureanalyse, limitierte Proteolyse und

verschiedene Immuntests wurde nachgewiesen, daß HR wenig strukturelle Gemeinsamkeiten mit BR aufweist.

3) Die BrCN-Spaltung und die Auftrennung der extrem hydrophoben Peptide durch HPLC wurde soweit optimiert, daß 10 saubere Peptide erhalten wurden. Sie wurden ansequenziert und ergaben ein Drittel der Aminosäuresequenz des HR. Die daraus gewonnene Information kann zur Identifizierung des Haloopsin-Gens mit Hilfe verschiedener Hybridisierungstechniken dienen. Durch Spaltung mit Jodosobenzoesäure und Auftrennung der Peptide gelang es, große HR-Fragmente für die Sequenzierung zu isolieren.

4) Chromophoruntersuchungen am nativen HR haben ein all-trans zu 13-cis-Retinalverhältnis von 3:1 in allen verfügbaren HR Proben ergeben. Reduktionen des Chromophors mit Hydroxylamin führten zu allen 4 möglichen all-trans- und 13-cis- syn- und anti-Retinaloximen. Reduktion mit Boranat führte zu einer planarisierten Retinylspezies.

5) Die Syntheserate des Haloopsins (Apoprotein) ist in Retinal-negativen Zellen sehr gering. Durch Zugabe von Retinal während des Wachstums nimmt sie jedoch bis zum Gehalt in Retinal-positiven Zellen zu. Das Apoprotein des HR inhibiert ebenso wie das des BR seine eigene Proteinbiosynthese.

6) Die Reduktion der Retinalproteine in Membranfraktionen verschiedener Bakteriorhodopsin negativen Mutanten und der Vergleich mit Aktivitätsmessungen hat ergeben, daß die

Proteine mit apparenten Molekulargewichten von 19 und 20 KD beide Retinalproteine sind und HR-Aktivität besitzen.

7) An künstlichen schwarzen Lipidmembranen wurde die HR-Transportaktivität in Tween-gewaschenen Membranfraktionen elektrisch nachgewiesen. Diese Experimente erbrachten einen unabhängigen Beweis dafür, daß HR eine Anionenpumpe mit Spezifität für Halogenide ist. Die K_m Werte von 8, 5 und 3 mM wurden für den Chlorid-, Bromid- bzw. Jodidtransport bestimmt. Mit Hilfe von Liposomen, in die das isolierte native Chromoprotein inkorporiert wurde, konnte durch elektrische Messungen an schwarzen Lipidmembranen gezeigt werden, daß es die volle Transportaktivität des HR besitzt und damit HR ist.

8) Mit Hilfe der Actinometerlösung Actinochrom N wurde die Quantenausbeute des HR-Photocyclus mit 0,36 Mol/E bestimmt.

9) In Gegenwart von anorganischen Basen kehrt das HR nach Lichtanregung über ein Intermediat, das bei 410 nm absorbiert, in den Grundzustand zurück. Diese HR-Form ($HR_{4,10}$) entsteht durch Abspaltung eines Chloridions und eines Protons. Für den Übergang beider Formen ineinander wurden Geschwindigkeits- und Gleichgewichtskonstanten bestimmt.

10) Durch Blitzlichtphotolyse wurde gezeigt, daß das Photozyklusintermediat $HR_{5,20}$ über eine bei 640 nm absorbierende Form ($HR_{4,40}$) in den Ausgangszustand ($HR_{5,80}$) zurückkehrt. Die Verzweigung zur $HR_{4,10}$ -Form erfolgt ebenso von dem $HR_{5,20}$ -Intermediat aus.

2. EINLEITUNG

2.1 Bakteriorhodopsin

Bakteriorhodopsin (BR) in der Zellmembran von *Halobacterium halobium* ist eines der am besten untersuchten Membranproteine und wird heute bereits als klassisches Beispiel für Energieumwandlung betrachtet (Stoeckenius et.al.,1979). Das Chromoprotein BR absorbiert grün-gelbes Licht (Abs.Max. 568 nm) und transportiert nach einer Photochemie im psec-Zeitbereich mit Hilfe als Reaktionszyklus ablaufender Dunkelreaktionen Protonen vektorieel über die Membran, wodurch über diese ein Protonengradient und ein Membranpotential (außen positiv) aufgebaut wird.

Unter Sauerstoffmangelbedingungen tritt in der Zelle das BR an die Stelle der Atmung und energetisiert die Zelle. Die protomotorische Kraft kann entweder zur ATP-Synthese oder zum Transport von Ionen und Aminosäuren genutzt werden (Hartmann et.al.,1977, Wagner et.al.,1978, Lanyi & MacDonald, 1976). Es läßt sich leicht ausrechnen, daß der Energiespeicher in Form des elektrochemischen Protonengradienten sehr begrenzt ist. Die Kopplung dieses Gradienten an das ATP-System bedeutet dagegen eine Steigerung der Energiespeicherkapazität um Faktor 100-1000 (Hartmann et.al.,1977). Darüber hinaus ist der elektrochemische

Gradient in der Lage, über einen H^+/Na^+ -Antiporter den Rückstrom von Protonen unter gleichzeitigem Ausstrom von Natriumionen zu treiben und damit den Protonengradienten in einen Na^+ -Gradienten umzuwandeln (Lanyi and Mac Donald, 1976). Da die Halobakterienmembran für Kaliumionen 20 mal durchlässiger ist als für Natriumionen, werden diese durch das Membranpotential elektrophoretisch in die Zelle hineingezogen (Wagner et.al., 1978). Das Resultat ist ein Kreislauf der Protonen mit angekoppelter ATP-Synthese und Austausch von Na^+ gegen K^+ (Abb.1A). Durch dieses kombinierte System wird die Energiespeicherkapazität um etwa den Faktor 10^5 erhöht (Oesterhelt, 1982).

Die kristalline Anordnung des BR in der Purpurmembran ermöglicht eine ungewöhnlich einfache Isolierung in sehr großen Mengen und hat das BR zu einem Modellobjekt für das Verständnis von Struktur-Funktionsbeziehungen von Transportproteinen in Membranen werden lassen.

Bei Belichtung von Halobakterienzellen ändert sich der pH des Mediums in komplexer Weise. Bei neutralem Ausgangs pH-Wert erscheint ein transienter pH-Anstieg von ca. 1 Minute ("alkalisches Überschießen"), dem ein langer pH-Abfall folgt (Abb.2A). Bei niedrigem Anfangs-pH des Mediums dominiert der pH-Abfall und bei hohen Anfangs-pH-Werten ist der pH-Anstieg größer. Diese Effekte wurden alle dem aktiven Protonentransport und daran gekoppelten sekundären Prozessen zugeordnet. Einige Autoren führten das alkalische Überschießen auf die ATP-Synthese zurück, bei der stochiometrisch Protonen verbraucht werden (Oesterhelt, 1975; Danan and Caplan, 1976; Bogomolni et.al., 1976).

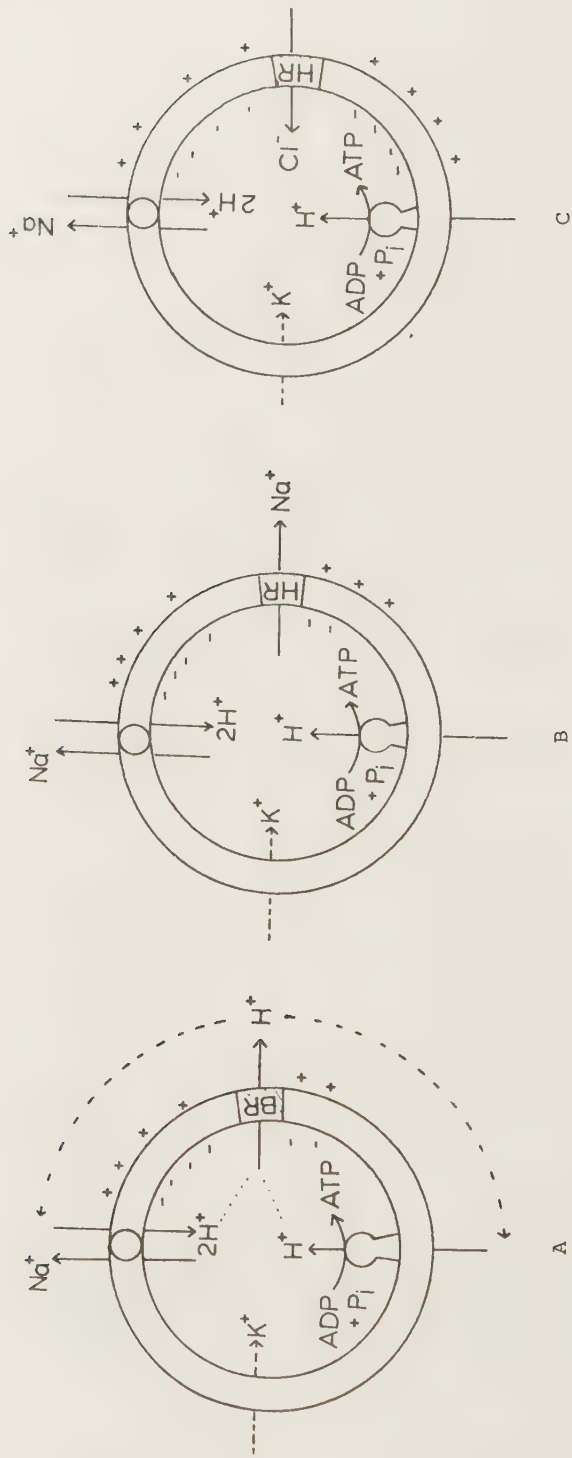


Abb. 1

A) Schematische Darstellung der durch BR induzierten Ionentranslokationen

B) Schematische Darstellung der durch HR induzierten Ionentranslokationen nach Lindley & Mac Donald (1979)

C) Schematische Darstellung der durch HR induzierten Ionentranslokationen nach heutiger Vorstellung

Abb.2

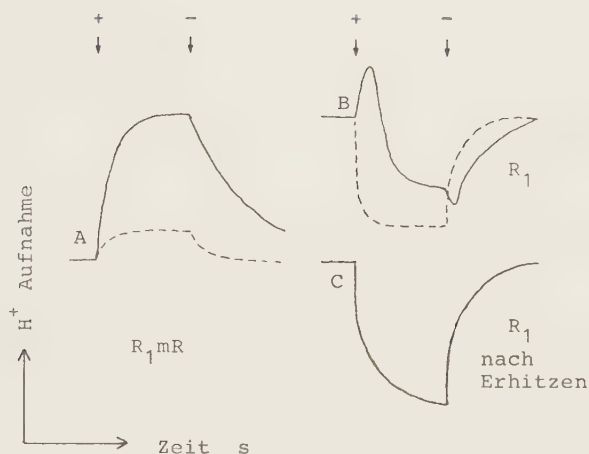


Abb.2 Lichtinduzierte pH-Änderungen in Halobakteriensuspensionen der Stämme: R_1mR (HR^+ , BR^-) (A), R_1 (HR^+ , BR^-) (B) und R_1 nach Erhitzen (C). Die unterbrochenen Spuren geben die pH-Antworten nach Zugabe des OH^-/Cl^- -Austauschers TPT ($2\mu M$) wieder (nach Mukohata & Kaji, 1981).

Hartmann und Oesterhelt zeigten jedoch 1976, daß das alkalische Überschießen nicht notwendigerweise mit der ATP-Synthese korreliert.

Diese Autoren erklären das alkalische Überschießen durch einen elektrogenen H^+/Na^+ -Antiporter. Ein elektrogener Antiporter, der getrieben durch das Membranpotential 2 Protonen gegen ein Natriumion austauscht, würde solange eine Alkalisierung des Außenmediums verursachen, bis ein Natriumgradient aufgebaut ist. Dieser gegen einen Kaliumgradienten aufgebaute Natriumgradient stoppt den Antiporter und eine Ansäuerung des Mediums durch die von BR gepumpten Protonen würde folgen (vgl. Abb 1A).

Mit dieser Vorstellung war man in der Lage, die bis dahin beobachteten Jonenflüsse einigermaßen zufriedenstellend zu

erklären.

2.2 Halorhodopsin

Matsumo-Yagi und Mukohata berichteten 1977, daß der BR negative Halobakterienstamm R,mR nur die lichtinduzierte Alkalinisierung des Mediums zeigt, die im Unterschied zum BR hitzeempfindlich ist. Zwei Jahre später zeigten Lindley und Mc Donald (1979), daß das lichtinduzierte Membranpotential und die Alkalinisierung des Mediums in diesen Stämmen durch Entkoppler nicht zerstört wird, wohl aber durch Valinomycin plus K^+ . Damit konnte das lichtinduzierte primäre Ereignis kein aktiver Protonentransport sein. Die Autoren identifizierten den primären Prozess mit Hilfe von $^{22}Na^+$ geladenen Zellvesikeln als lichtgetriebenen Natriumtransport nach außen. Dieser Natriumtransport wurde mittels Fluoreszenzmessungen von Green und Lanyi (1979) bestätigt. Die beobachtete Alkalinisierung wurde als passiver Protoneneinstrom, der dem Membranpotential folgt, interpretiert (z.B. durch den Fo-Teil der ATP-ase, Abb.1B).

Das für diesen aktiven Transport verantwortliche Protein wurde Halorhodopsin (HR) genannt (Mukohata,1980).

Mukohata und Kaji zeigten 1981 zwei weitere wichtige Effekte. 1. Auch in BR negativen Mutanten findet Photophosphorylierung statt (vgl. auch Wagner et.al.,1981) 2. Der spezifische Cl^-/OH^- -Austauscher Triphenylzinn (TPT) verhindert diese ATP-Synthese und den passiven Protoneneinstrom (Abb.2B).

Richtig gedeutet wurden die Experimente von Mukohata und Kaji, Lindley und Mac Donald und Green und Lanyi allerdings erst 1982 von Schobert und Lanyi. Sie führten Lichtstreuungsmessungen an Zellvesikeln in 4M NaCl durch und fanden lichtinduziertes Anschwellen bei den BR negativen Mutanten, was bedeutet, daß diese Vesikel Salz aufnehmen. Da das Schwellen nur in Chlorid und Bromid unabhängig vom Kation auftrat, identifizierten Schobert und Lanyi das Halorhodopsin als lichtgetriebene Chloridpumpe, die Chlorid in die Zelle hinein transportiert. Die Fähigkeit des HR, Chlorid zu transportieren, machte auch den von Mukohata und Kaji 1981 beschriebenen entkoppelnden Effekt des TPT verständlich (Abb.2). Durch diesen Cl^-/OH^- -Austauscher wird die Chloridpumpe in der Membran "kurzgeschlossen". Der passive Protoneneinstrom ist davon unabhängig, ob Natrium aus der Zelle heraus oder Chlorid hineingepumpt wird (vgl. Abb.1B und C), da das Membranpotential in beiden Fällen das gleiche Vorzeichen hat. Mit dieser Vorstellung über die HR-Aktivität konnten auch komplexere pH-Spuren in verschiedenen Zelltypen interpretiert werden.

Die Verwendung des Protonenleiters Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon (CCCP) und des lipophilen Kations Tetraphenylphosphonium (TPP^+) machen es möglich, in verschiedenen Zelltypen die BR- und die HR-Aktivität zu separieren (Abb.3, Oesterhelt, 1982 II).

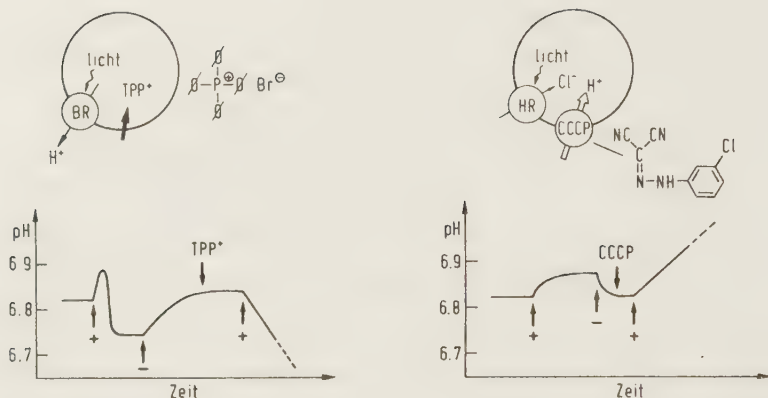


Abb.3 Testsysteme für BR- und HR-Aktivitäten. Die BR-Aktivität wird aus der Anfangsgeschwindigkeit der lichtinduzierten Azidifizierung in Gegenwart des lipophilen Kations Tetraphenylphosphonium (TTP, 250 μ M) ermittelt (A), die HR-Aktivität aus der Anfangsgeschwindigkeit der Alkalinisierung in Gegenwart eines Protonencarriers (CCCP, 50 μ M). Wechselzahlen: 250 transportierte Protonen/min·BR: 300 transportierte Chloridionen/min·HR.

TPP* passiert sehr schnell die Membran und reagiert schneller auf das Membranpotential als alle anderen anwesenden Ionen. Damit ist nur aktiver Protonentransport mit der Elektrode meßbar. In Gegenwart des Entkopplers ist die Membran sehr stark durchlässig für Protonen. Aktiv transportierte Protonen fließen sofort zurück und es werden nur passiv transportierte Protonen, die auf ein durch andere Transportsysteme aufgebautes Membranpotential reagieren, gemessen (Abb.3).

Spektroskopische Messungen

Aktionsspektren der pH-Änderungen in ganzen R₁mR Zellen (Green and Lanyi, 1979, Weber and Bogomolni, 1980) sowie der Änderung des Membranpotentials und der lichtinduzierten pH-Änderung in Zellvesikeln (Matsumo-Yagi and Mukohata, 1977 I+II) ließen darauf schließen, daß das Maximum der Absorptionsbande des HR bei 585-590 nm liegt.

Absorptionsspektroskopie am HR wurde erst möglich, als Stämme ohne störende Pigmente wie Bacterioruberin und andere Carotinoide verfügbar waren. Die zwei am häufigsten benutzten Stämme sind ET-15 (Green and Lanyi, 1979; Weber and Bogomolni, 1980) und L-33 (Lanyi, 1981; Wagner et.al., 1981).

Lanyi und Weber (1980) rekonstituierten durch Licht und Hydroxylamin gebleichtes HR in ET-15 Zellvesikeln und erhielten Differenzspektren mit einem Maximum bei 588 nm .

Weber und Bogomolni (1981) nutzten die Differenzspektroskopie zur ersten Untersuchung der Photoprodukte. Sie postulierten zwei verschiedene HR-Photozyklen, einen für hohe und den anderen für niedrige Chloridkonzentrationen (Abb.4). Die beiden HR-Grundzustände A und B, von denen die beiden Zyklen ausgehen, lassen sich durch Chlorid reversibel ineinander überführen.

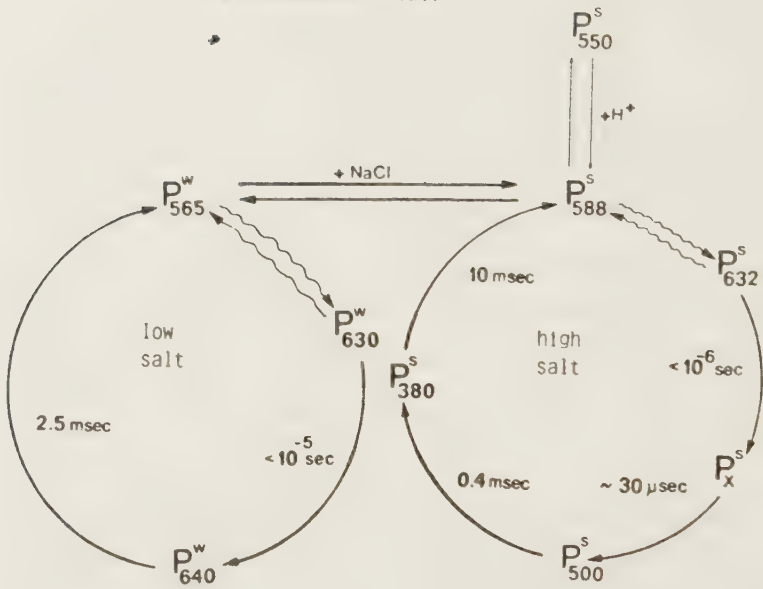


Abb.4 Photozyklus des HR bei hohen (P_{588}^s) und bei niedrigen (P_{565}^w) Salzkonzentrationen. Die gewellten Pfeile bezeichnen Photoreaktionen, die geraden thermische Reaktionen.

2.3 Slow Rhodopsin

Bewegliche Halobakterienzellen werden von langwelligem Licht ($\lambda > 520$ nm) angezogen und durch kurzwelliges Licht ($\lambda < 520$ nm) abgestoßen (Hildebrand and Dencher, 1975).

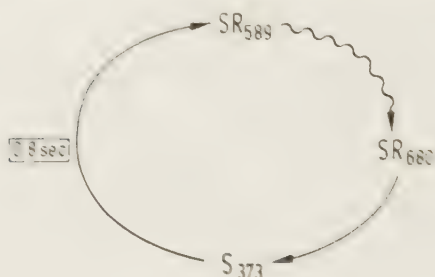
Diese phototaktische Antwort wird durch einen oder mehrere Photorezeptoren mit Retinalchromophoren vermittelt (Sperling und Schimz, 1980). Die beiden bisher beschriebenen Chromoproteine HR und BR haben Absorptionsspektren, die sehr ähnlich dem Aktionsspektrum für die "anziehende" phototaktische Antwort sind.

Ursprünglich wurde BR für den Photorezeptor der langwelligen Antwort gehalten und die Existenz anderer noch unbekannter Retinalproteine sollte die kurzwellige Antwort erklären. Mit dem Auffinden phototaktisch aktiver BR^- , HR^+ Mutanten wurde die langwellige phototaktische Antwort dem HR zugesprochen (Stoeckenius and Bogomolni, 1982).

Bogomolni und Spudich beschrieben 1982 ein drittes Chromoprotein in HR und BR negativen Halobakterienstämmen, daß sowohl die langwellige als auch die kurzwellige phototaktische Antwort ermöglicht. Da der Chromophor nach Belichten ausbleicht und erst nach ca. 1 sec in den Ausgangszustand zurückkehrt (Abb.5), wurde es "slow cycling rhodopsin" oder einfach Slow Rhodopsin (SR) genannt.

Abb.5

Photochemical cycle of slow rhodopsin (SR)



Das langlebige Photocyclusintermediat hat sein Absorptionsmaximum bei 373 nm (Abb.5) und konnte damit der Blaulichtrezeptor sein (Bogomolni & Spudich, 1982). Der endgültige Beweis für diese Hypothese ist jedoch noch nicht erbracht.

Auffällig ist jedoch, daß die Aktionsspektren des Protonentransportes, des Chloridtransportes (Bamberg et.al., 1983) und der "anziehenden" phototaktischen Antwort alle ihr Maximum zwischen 560 und 590 nm haben. Damit sind alle drei hierfür verantwortlichen Pigmente in der Zelle sehr fein aufeinander abgestimmt, d.h. das phototaktische aktive Pigment führt die Zelle zum Licht derjenigen Wellenlänge, in dem die anderen Pigmente BR und HR die größte Aktivität zeigen.

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Mit dem Halorhodopsin als lichtgetriebener Ionenpumpe wurde ein neues Membranprotein gefunden, das sich in besonderem Maße für bioenergetische Untersuchungen zu eignen schien. Da es ein Chromoprotein ist, läßt sich die Aktivität durch Licht steuern. Die Tatsache, daß HR andere Ionen als H^+ oder OH^- transportiert, hat den Vorteil, daß das Protein in Lösungen, die frei von diesen Ionen sind, untersucht werden kann und die Aktivität damit auf zweifache Weise induzierbar ist, erstens durch Licht und zweitens durch selektive Zugabe des transportierten Ions.

Der Chromophor bot außerdem eine gute Möglichkeit, das Protein an Hand seiner Absorption oder der markierten prosthetischen Gruppe zu isolieren.

Um den Mechanismus des Ionentransportes zu verstehen, ist es ein wichtiges Ziel, die Primärstruktur des HR aufzuklären.

Auf Grund der molekularbiologischen Kenntnisse ist man jedoch nicht mehr darauf angewiesen, das HR auf der Proteinebene zu sequenzieren, sondern es bietet sich an, die Sequenzinformation über das Gen zu erhalten. In der vorliegenden Arbeit sollten unter anderem Voraussetzungen für die Isolierung des HR-Gens geschaffen werden. Hierfür gibt es verschiedene Möglichkeiten. Die erste Notwendigkeit ist in jedem Falle die Isolierung der Polypeptidkette. Wenn sich Antikörper gegen diese erzeugen lassen, so können mit

Hilfe der Antikörper die Klone einer Genbank identifiziert werden, die antigene Determinanten des HR exprimieren. Mit diesen DNA-Stücken läßt sich dann in einer zweiten Genbank, in der größere Halobakterien-DNA-Stücke kloniert sind, das vollständige HO-Gen lokalisieren. Parallel sollte versucht werden, Teilsequenzen des HR zu erhalten. Auf Grund der dadurch gewonnenen Information lassen sich Oligonukleotide synthetisieren, die Teilsequenzen des HR codieren. Mit diesen ist nach radioaktiver Markierung eine direkte Koloniehybridisierung möglich. Ein dritter Weg der Genisolierung ist die Herstellung von HO-c-DNA mit Hilfe der Oligonukleotide als Primer für reverse Transkriptase.

3.1 Halorhodopsinisolierung

3.1.1 Isolierung von denaturiertem einbandigem Halorhodopsin

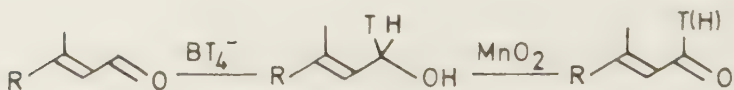
Bakteriorhodopsin kann als natives Chromoprotein aus S9 Zellen leicht isoliert werden, da es in der Purpurmembran zweidimensionale Kristalle bildet und mehr als 50 % der gesamten Zellmembranoberfläche bedeckt. Durch Lyse der Zellen und Membranfraktionierung durch Sucrose-Dichtezentrifugation erhält man große Mengen an gereinigtem BR.

Im Gegensatz dazu tritt HR in 10 (OD₂) bis 100-fach (L-07) kleineren Konzentrationen in der Zellmembran auf und reichert sich nicht in einer speziellen Membranfraktion an. Außerdem ist der HR-Chromophor gegenüber Solubilisierung der Membran mit Detergentien sehr empfindlich. Alle Versuche, das HR in nativer Form zu isolieren, sind lange fehlgeschlagen. Deshalb wurde das HR im Rahmen dieser Arbeit denaturiert isoliert.

a) Radioaktive Markierung, Reduktion des Chromophors und Präparation der Gesamtmembranfraktion.

Für die Isolierung wurden aus Retinal negativen L-07 Zellen durch Beschallen Zellvesikel präpariert und diese durch Zentrifugation isoliert. Typische Ausbeuten sind 2 g Vesikel aus 15 l Kultur. [³H]-Retinal mit hoher spezifischer Radioaktivität wurde durch einfache Reduktion und

Reoxidation erhalten (Lanyi and Oesterhelt, 1982):



Die Rekonstitution des HR in Zellvesikeln kann durch Differenzspektroskopie (Lanyi and Weber, 1980; Lanyi and Oesterhelt, 1982) und Messung der HR-Aktivität verfolgt werden. Als Test wurde der lichtinduzierte durch Entkoppler verstärkte Protoneneinstrom gemessen (Abb.3). Dabei ist bei ausreichender Entkopplerzugabe die Anfangsgeschwindigkeit der pH-Änderung proportional zur Menge an rekonstituiertem HR. Die spezifische Transportaktivität ist in L-07 Zellen jedoch nur 10 % von der in L-33 Zellen. Aufgrund der Entdeckung des Slow Rhodopsins in Halobakterien wurde die geringe spezifische Aktivität in L-07 Zellen so interpretiert, daß HR nur 10 % Anteil am Chromophor hat und die restlichen 90 % SR sind. Der spezifische Chromophorgehalt in L-07 Zellen ist ca. 1 nMol/mg Protein.

Rekonstitution in ganzen Zellen führt im Gegensatz zu der in Vesikeln zu keiner HR-Pumpaktivität (Hegemann et.al., 1982), d.h. in ganzen Zellen wird nur SR rekonstituiert.

Für die Isolierung des denaturierten HR war es notwendig, die Retinal-Proteinbindung durch Reduktion zu stabilisieren, damit diese bei der Denaturierung durch SDS nicht hydrolysiert wird. Reduktion des Retinylidenproteins mit

Cyanborhydrid in Gegenwart von Diethylether ergibt einen großen Anteil an Retinylprotein (RP) (Lanyi and Oesterheld, 1982), das als radioaktiver Marker verwendet wurde.

HALOOPSIN + RETINAL $\rightarrow$ RETINYLIDENPROTEIN $\rightarrow$ RETINYLPROTEIN

Um nicht gebundene Radioaktivität in präparativen Ansätzen zu vermeiden, wurde das HR mit substochiometrischen Mengen [^3H]-Retinal rekonstituiert.

b) Isolierung des markierten Retinylproteins

Nach Rekonstitution und Reduktion wurden die Vesikel mit Wasser lysiert, die Zellmembranfragmente durch Zentrifugation sedimentiert und die erhaltene Gesamtmembranfraktion (GMF) in 4 % SDS gelöst. Die hohen SDS-Konzentrationen waren notwendig, um die Membranproteine monomer zu lösen. Der nächste Reinigungsschritt war eine Gelfiltration mit Ultrogel AcA 44 (Abb.6). Das Retinylprotein eluierte als scharfer radioaktiver Gipfel mit einem K_d -Wert von 0,5. Es wurde von der Hauptproteinmenge, die ein größeres Molekulargewicht besitzt, und von niedermolekularem Material, das radioaktives Retinol und dessen Abbauprodukte enthält, abgetrennt.

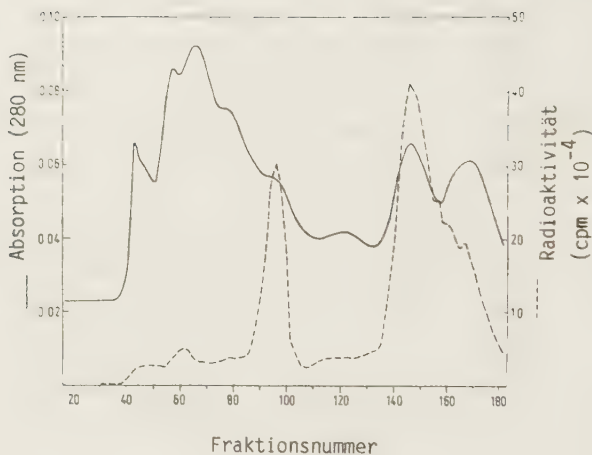


Abb.6 Gelfiltration der [^3H]-Retinal markierten und reduzierten L-07 GMF in 4 % SDS auf AcA 44 Ultrogel. Elutionsprofil des bei 280 nm absorbierenden Materials (—) und Radioaktivität (---). Das [^3H]-RP eluiert in den Fraktionen 90-100, niedermolekulare Verbindungen (hauptsächlich Retinol) nach Fraktion 135.

Die extreme Tendenz des RP, zu Oligomeren und Polymeren zu aggregieren, erforderte neben den hohen SDS-Konzentrationen eine möglichst geringe Ionenstärke, da in Gegenwart von zusätzlichem Salz das meiste Retinylprotein mit dem Ausschlussvolumen eluierte. Diese Aggregation kann auf den Einfluß von Salz auf die kritische Mizellenkonzentration von SDS und auf die hydrophobe Wechselwirkung zurückgeführt werden (Helenius et.al., 1979). Die RP-Fractionen der Gelfiltration wurden direkt auf eine Hydroxylapatitsäule gegeben und unter Bedingungen wie in Abb.7 beschrieben eluiert.

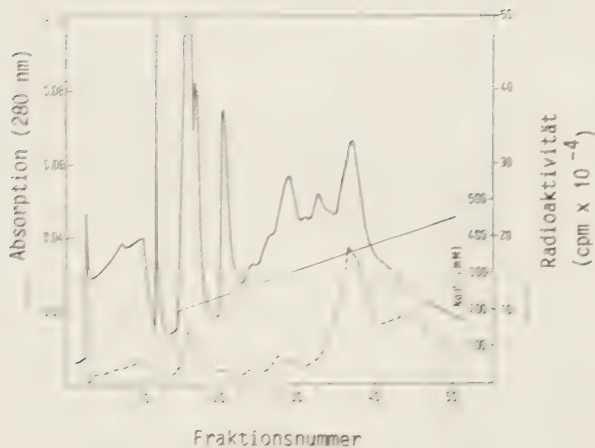


Abb.7 SDS-Hydroxylapatitchromatographie (Biogel HT) der gesammelten PP-Fraktionen 93-97 der Gelfiltration in Abb.6. Elutionsprofil des bei 280 nm absorbierenden Materials (—), Radioaktivität (----) und Phosphatgradient sind gezeigt. Der kleine radioaktive Gipfel am Anfang des Gradienten resultiert aus Abbauprodukten des radioaktiven Markers. Das Petinylprotein eluiert in zwei breiten radioaktiven Fraktionen (35-50).

Radioaktivität eluierte von 300 bis 500 mM Natriumphosphat in zwei breiten Gipfeln zwischen Fraktion 35 und 50. Beide enthalten das gleiche RP, wie durch analytische SDS-PAGE gezeigt wurde. Der Grund der unterschiedlichen Elution konnte nicht geklärt werden. Der Hauptvorteil des Apatitschrittes ist das Entfernen von Protein mit sehr ähnlichem MW wie das RP.

Der letzte Reinigungsschritt war die preparative SDS-PAGE (Waehnelt, 1971). Um Aggregation des Retinylproteins zu vermeiden, enthielten die Gele 3M Harnstoff. Abb.8 zeigt das Elutionsprofil der Radioaktivität.

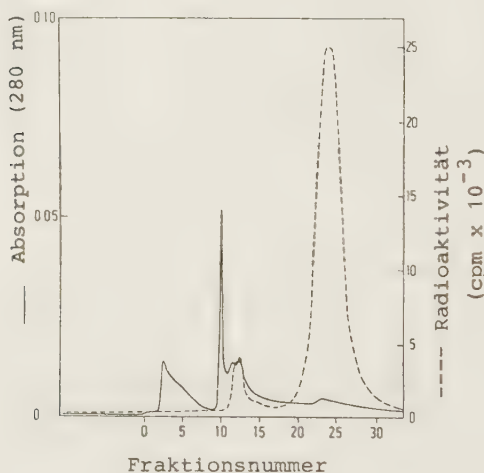


Abb.8 Präp. SDS-PAGE der gesammelten Fraktionen 35-50 der Apatittrennung auf einem LKB Uniphor-7900 Gerät. Das bei 280 nm absorbierende Material in Fraktion 2-11 sind Substanzen aus dem Gel (Righetti & Secchi, 1972). Der erste kleine radioaktive Gipfel enthält niedermolekulare Radioaktivität, die durch Zerfall des [³H]-RP zustande kommt. Die Elektrophorese wurde nach 35 Fraktionen gestoppt.

Nach einer niedermolekularen Radioaktivität, die aus dem Zerfall des Retinylmarkers resultiert, folgte das Retinylprotein im Hauptgipfel. Die 280 nm Absorption zeigte nur einen kleinen Proteingipfel des Retinylproteins und zwei weitere Gipfel, die Gelverunreinigungen und den Farbindikator enthalten (Gelfront). Die weiteren Proteine eluierten

nach Fraktion 30 und sind in Abb.8 nicht zu sehen. In der analytischen SDS-PAGE läuft das saubere RP mit einem app. MW von 20KD als scharfe Einzelbande (Abb.9, Spur E+F) wenig schneller als BR.

Abb.9

Analytische SDS-PAGE in 3M Harnstoff der ^3H -RP enthaltenden Fraktionen der HR Anreicherung aus L-07 Zellen. Das Gel wurde mit Coomassie Blau G 250 angefärbt.

A: Marker: BSA (68KD), BR (26KD), Cyt C (12,5 KD)

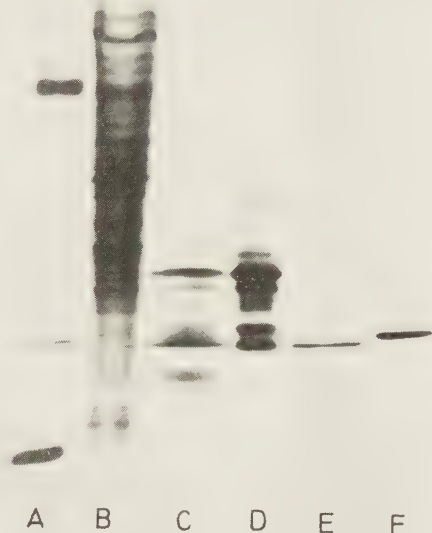
B: Lysat der markierten Zellvesikel

C: RP-Fraktion nach Gelfiltration

D: RP-Fraktion nach Apatit

E: RP nach prep. SDS-PAGE

F: BR



Die Proteinfraction nach Apatit (Spur D) scheint sich von der nach Gelfiltration (Spur C) kaum zu unterscheiden, obgleich man ohne den Apatitschritt kein sauberes Retinylprotein (RP) erhält. Spur B zeigt die Gesamtmembranfraktion, von der sehr viel aufgetragen wurde, um das RP zu zeigen. Das Endprodukt ist gegenüber dem HR in L-07 Vesikeln um Faktor 400 angereichert, gegenüber HR in der Zelle um Faktor 3000. Die Ausbeute beträgt ungefähr 30 %.

Die Autoradiographie des Gels in Abb.9 zeigt, daß das RP

bei 20KDa die einzige radioaktive Proteinbande ist (vgl. auch Lanyi & Oesterhelt, 1982). Der apparente Molekulargewichtsunterschied zwischen BR und HR beträgt ungefähr 1200 Dalton. Das app. MW des BR ist auf dem SDS-Gel 21500 und damit um einiges geringer als das wahre MW von 25700. Eine Erklärung für dieses ungewöhnliche Verhalten ist der hydrophobe Charakter des BR (Raynold & Tanford, 1970). Da HR ähnlich hydrophob ist, kann man annehmen, daß das wahre MW des HR annähernd 25000 Dalton ist. (Lanyi & Oesterhelt, 1982).

3.1.2 Isolierung von denaturiertem zweibandigem Halorhodopsin

Nach ersten proteinchemischen Vergleichen zwischen HR und BR schienen beide Proteine kaum Sequenzhomologien zu haben (siehe unten). Deshalb war es nötig, größere Mengen HR zu isolieren, um Untersuchungen zur Strukturaufklärung durchführen zu können.

Da das Verhalten des HR bei der Isolierung durch die Verwendung von radioaktiv markiertem HR bekannt war, wurde das Apoprotein (Haloopsin) daraufhin aus L-33 Zellen (HR^+ , BR^- , Ret^+) isoliert, die die 10-fache Menge Chromoprotein enthalten (vgl. Kap. HR-Induktion). Das Isolierungsverfahren konnte wesentlich verkürzt werden.

Nach Dialyse der Zellen gegen Wasser wurde aus dem Gesamtlysat die GMF durch Ultrazentrifugation isoliert. Diese wurde dann mit Tween 20, einem hydrophilen Detergens, gewaschen, um nichtintegrale Membranproteine zu entfernen.

Die Ausbeute an HR-Chromoprotein wurde durch Differenzspektroskopie gegen eine mit SDS gebleichte Probe gemessen. Beide Kuvetten enthielten 1 % Octylglycosid, wodurch die Proben sehr viel klarer wurden. Unter diesen Bedingungen bleicht das SR aus (Bogomolni and Spudich, 1982), und die Menge an HR-Chromophor ist bestimmbar. Im Gegensatz zur Methode von M. Steiner (1983) wurde die Tweenmembran (MFT) chloridfrei präpariert, um Aggregation bei der weiteren Reinigung zu vermeiden. Diese MFT wurde als sauberste verfügbare Membranfraktion für spektroskopische Messungen und zur Rekonstitution der HR-Aktivität an künstlichen Lipidmembranen verwendet. Die Anwesenheit von Chlorid hat den Nachteil, daß erstens die Membran trüb wird und zweitens keine Halogenidabhängigkeiten mehr meßbar wären. Zur weiteren Isolierung des Retinylproteins wurde die MFT in 4 % SDS gelöst und das Haloopsin auf Ultrogel AcA 44 von allen anderen Proteinen abgetrennt (Abb. 10). Um ein sauberes Protein zu erhalten, wurde die Säule gegenüber Methode I um 30 % verlängert und aus dem HR-Gipfel nur der Mittelteil (entsprechend der Halbwertsbreite) isoliert. Das Produkt brauchte nicht weiter gereinigt zu werden. Die Apatitsäule wurde zur Herabsetzung der SDS-Konzentration von 4 % auf 0,1 % verwendet. Das Gel in Abb. 11 zeigt, daß ein Material erhalten wird, das dem aus L-07 Zellen angereicherten Retinylprotein entspricht.

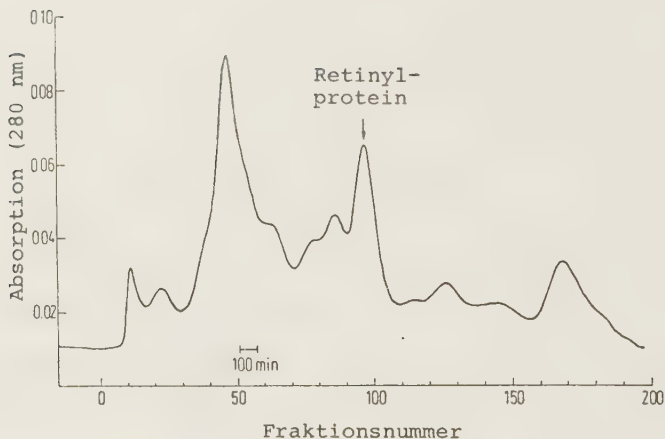


Abb.10 Gelfiltration von gelöster L-33 Tweenmembran in 4 % SDS auf AcA 44 Ultrogel. Laufgeschwindigkeit 1,6 ml/min.

Abb.11

Analytische SDS-PAGE der RP
enthaltenden Fraktionen der
HR Anreicherung aus L-33
Zellen. Das Gel wurde mit
Silber angefärbt.

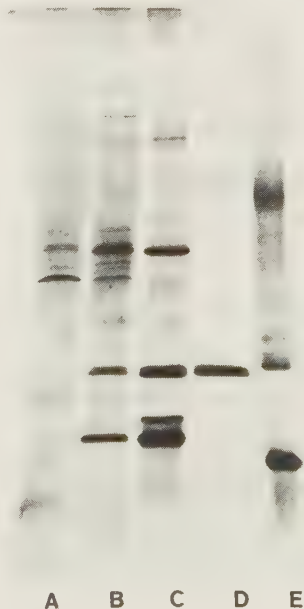
A: Zelllysat

B: Gesamtmembranfraktion

C: Tweenmembran

D: HR nach der Gelfiltration
auf AcA 44 Ultrogel

E: BSA, BR, Cyt C



Die Methode II hat den Vorteil, daß die aufwendige präp.

SDS-PAGE vermieden wird. Außerdem liegt die Gesamtausbeute bei 50 %. Abb.11 zeigt aber, daß die Proteinbande des gereinigten HR recht breit ist im Vergleich zu Abb.9. Wird weniger Protein aufgetragen, so ist klar ersichtlich, daß das HR doppelbandig mit app. Molekulargewichten von 19 und 20KD vorliegt. (Vergleich von ein- und zweibandigem HR im Kap.: HR-Induktion) Der Reinigungsfaktor gegenüber dem Zellysatz beträgt 280, gegenüber der GMF 35.

3.1.3 Isolierung von nativem Halorhodopsin

Für die in späteren Kapiteln beschriebenen Chromophor- und Funktionsstudien wurde als natives Chromoprotein isoliertes HR benötigt. Dieses wurde nach der Methode III in Abb.12 angereichert. Das Verfahren wurde von Steiner (1983) entwickelt und führt ebenfalls über die MFT, die in 4 M Salz und milden Detergenzien (Lubrol PX) unter Erhalt des HR-Chromophors gelöst wird. Die Membranproteine werden in Gegenwart von 4 M Chlorid und Detergens durch hydrophobe Chromatographie und Hydroxylapatit fraktioniert. Gegenüber der Methode von Steiner wurden zwei kleine Veränderungen eingeführt. Erstens wurde die Tweenmembran in Abwesenheit von Chlorid präpariert und zweitens bei der Apatittrennung 5mM Phosphat zugegeben, um Absorption des HR an der Säule zu vermeiden.

3.1.4 Vergleich der verschiedenen Anreicherungsverfahren

Abb.12 zeigt einen Vergleich der verschiedenen Anreicherungsverfahren. Die Isolierungsverfahren I+II führen zu denaturierten Produkten, die ausschließlich für Strukturuntersuchungen und Antikörperproduktion verwendet werden konnten. Durch Verfahren III wird dagegen ein natives Chromoprotein erhalten, mit dem es zusätzlich möglich ist, den Chromophor und die Funktion des HR näher zu untersuchen. Ein ähnliches Verfahren wurde kürzlich auch von Taylor und anderen (1983) beschrieben. Es hat aber den großen Nachteil, daß als Detergens ausschließlich Octylglucosid verwendet wird. Die nativen Aufarbeitungen sind recht aufwendig und wegen der Verwendung von OG z.Z. noch sehr teuer. Einbandiges HR aus rekonstituierten L-07 Zellen läßt sich nativ bisher nicht isolieren (vgl. Steiner,1983), sondern nur denaturiert mit der ebenfalls aufwendigen Methode I. Methode II ist das bequemste, einfachste und billigste Anreicherungsverfahren und ist von Nutzen für Proteinspaltungen des denaturierten HR, für die viel Material gebraucht wird. Mit allen drei Verfahren erhält man also Halorhodopsin in verschiedener Form für verschiedene Zwecke.

Halorhodopsin - Anreicherungsverfahren

HALOBAKTERIENZELLEN

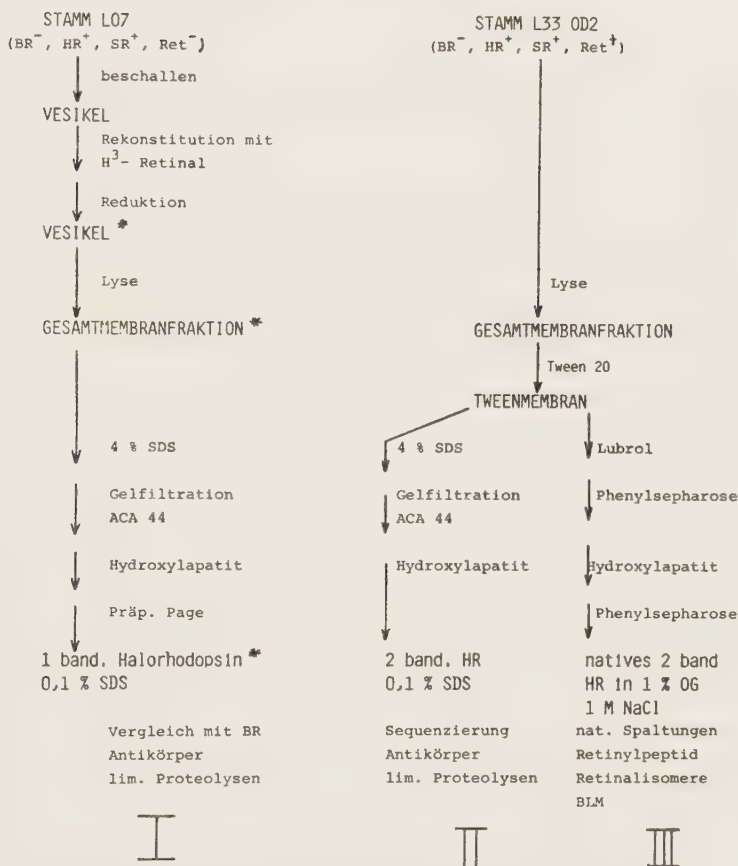


Abb.12 Schema der Halorhodopsinanreicherungsverfahren mit ihren einzelnen Reinigungsschritten. Unten ist aufgeführt, welche Versuche mit den einzelnen Endprodukten durchgeführt wurden.

3.2 Untersuchung zur Primärstruktur

3.2.1 Aminosäurezusammensetzung

In Abb.13 werden Aminosäureanalysen verschiedener HR Präparationen verglichen.

Spalte I gibt die Aminosäureanalyse des nach Methode II isolierten HR wieder. Für die Analyse in Spalte II wurde dieses HR noch über eine HPLC C18 300A Säule (Baker) nachgereinigt. Spalte III gibt die Analyse des nativ isolierten HR wieder. In Spalte IV und V sind die theoretischen (Sequenz) und die gefundenen Aminosäurezusammensetzungen des BR zum Vergleich aufgeführt.

Bemerkenswert ist, daß sich die verschiedenen HR-Proben signifikant unterscheiden. Da der N-Terminus blockiert ist, fällt die Endgruppenbestimmung als Reinheitskriterium für das HR aus. Eine Deblockierung durch Pyroglutamase oder Säurebehandlung war nicht erfolgreich. Das analytische SDS-Gel als einziges Kriterium zeigt, daß alle diese HR-Proben auch nach Anfärbung der Proteine mit Silber nur die eine Doppelbande bei 19 und 20 KDa zeigen. Ein Cystein wurde durch direkte Bestimmung und als Carboxymethylcystein im nativ isolierten HR gefunden.

Abb.13 Aminosäureanalysen von HR und BR

Aminosäure	HR (II)	HR (HPLC)	HR (nativ)	BR (theor.)	BR (gef.)
Asp	17	16	13	12	14
Thr	13	15	17	13	16
Ser	11	11	17	13	12
Glu	19	14	16	13	15
Pro	13	11	10	11	11
Gly	26	20	20	25	25
Ala	28	29	31	29	29
Cys	-	-	1	-	-
Val	21	26	21	21	21
Met	5	5	6	9	9
Ile	12	13	11	15	15
Leu	24	29	28	36	36
Tyr	7	7	6	11	10
Phe	10	10	9	13	13
Lys	5	5	4	7	7
His	3	3	2	-	-
Arg	10	10	12	7	7
Trp	7	7	7	8	7
Polaritätsindex	0,33	0,35	0,33	0,3	0,3

HR (II) ist nach Verfahren II angereichertes Halorhodopsin. HR (HPLC) ist nach Verfahren II angereichertes und durch HPLC nachgereinigtes Halorhodopsin. HR nativ ist nach Verfahren III angereichertes natives Halorhodopsin. BR (theor.) entspricht der Zusammensetzung nach der von Khorana et.al. (1979) ermittelten Sequenz. Die Polaritätsindices wurden nach Capaldi und Vanderkooi (1972) bestimmt. Bei einem Index von 1 liegen nur polare Aminosäuren vor.

Unter den Analysen ist jeweils der Polaritätsindex angegeben, der nach Capaldi und Vanderkooi (1972) bestimmt wurde. Daraus geht für HR hervor, daß das Protein ähnlich wie BR (0.3) extrem hydrophob ist. Selbst unter den Membranproteinen, die nur mit Detergenzien oder organischen Lösungsmitteln aus der Membran entfernt werden können, gehört das HR mit einem Polaritätsindex von 0.35 (Skala von 0-1) zu den unpolarsten (Capaldi and Vanderkooi, 1972). Bei einem Index von 1 liegen nur polare Aminosäuren vor.

3.2.2 Limitierte Proteolyse mit V8-Protease

Limitierte Spaltung von Proteinen unbekannter Struktur mit Enzymen dient dazu, erste Sequenzhomologien zu anderen bekannten Proteinen zu zeigen. Dabei wird mit spezifischen Enzymen verschieden lange gespalten, um eine möglichst statistische Verteilung von Peptiden unterschiedlicher Größe zu erhalten, die sich auf dem SDS-Gel oder durch Dünnschichtchromatographie auftrennen lassen. Durch den Vergleich der Spaltmuster verschiedener Proteine läßt sich sofort entscheiden, ob sie größere gemeinsame Sequenzbereiche haben oder nicht.

Die V8-Protease wurde verwendet, um erste Vergleiche der Primärstrukturen von HR und BR durchzuführen. Dazu wurden reduzierte L-33 Membranfraktionen mit V8-Protease inkubiert und der Spaltansatz auf einem SDS-Gel aufgetrennt.

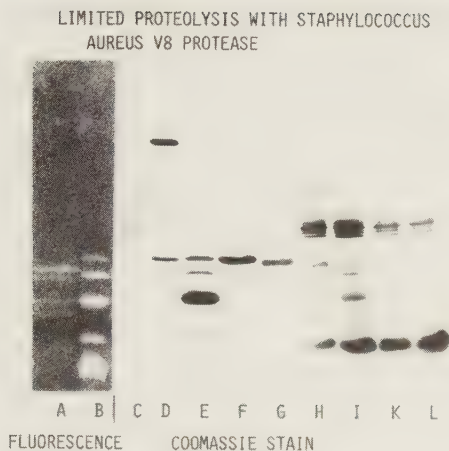


Abb.14 HR und BR und Abbauprodukte nach limitierter Proteolyse mit V8-Protease auf einem SDS-Gel.

A: Fluoreszenz der HR Retinylpeptide nach Spaltung der L33 MFT (2h).

B: Fluoreszenz der BR Retinylpeptide nach Spaltung der PM.

C: V8-Protease

D: BSA, BR, Cyt C

E: BR Peptide nach Spaltung

F: BR

G: HR

H: HR Peptide nach 1,2,4,6 h Spaltung

In Abb.14A sind 4 fluoreszierende HR Peptide zu sehen. Es war also möglich, in einer völlig heterogenen Membranfraktion mit Hilfe der Fluoreszenz ein Peptidmuster eines einzelnen Proteins sichtbar zu machen. In Abb.14B ist das fluoreszierende Peptidmuster des BR zu sehen. Es zeigt sich bereits hier, daß HR und BR eine unterschiedliche Struktur haben, da keine gemeinsamen Peptide vorkommen. Der Vergleich mit dem Coomassie angefärbten Spaltmuster des gereinigten HR in Abb.14G-L zeigt, daß diese Peptide mit dem Fluoreszenz-

muster in Abb.14A gut übereinstimmen. In der MFT wurde also ausschließlich HR zum Retinylprotein reduziert.

3.2.3 Bromcyanspaltung und Isolierung der Peptide

Die Sequenzierung von integralen Membranproteinen steht noch in den Anfängen und über Fortschritte ist nur in wenigen Fällen berichtet worden (Tamita and Morchesi,1976; Wickner,1976; Allen 1978). Vollständige Aminosäuresequenzen sind bisher nur von zwei großen Membranproteinen ($MG > 20000$) bekannt: erstens vom BR (Ovchinnikov et.al.,1979; Khorana et.al.,1979) und zweitens vom Rinderrhodopsin (Ovchinnikov et.al.,1982; Ovchinnikov,1982). Proteine, die nur einmal durch die Membran reichen und damit nur partiell hydrophob sind, und kleinere hydrophobe Proteine ($MG < 10000$) wurden bereits mehrere sequenziert (Cytochromoxidaseuntereinheiten, Hüllprotein des filamentösen Virus M13, Cytochrom b5, Sialoglycoprotein, Glycophorin, DCCD Bindepotein der Protonen-ATPase).

Enzymatische Spaltungen von wasserunlöslichen Membranproteinen sind nicht ohne weiteres durchführbar. Aus diesem Grunde haben chemische Spaltungen bei Membranproteinen besondere Bedeutung erlangt, da sie in konzentrierten organischen Säuren und hohen Ionenstärken durchgeführt werden können (Gerber & Khorana,1982). Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit das HR zuerst mit Bromcyan gespalten (vgl. Khorana et.al., 1979). Das HR ist jedoch sehr viel säureempfindlicher als BR. Daher wurde die Reaktionszeit von

24 auf 5 Stunden verkürzt. Das lyophilisierte Spaltgemisch wurde zur Abtrennung der kleinen von den großen, sehr hydrophoben Peptiden mit 10 % Ameisensäure extrahiert. Die Extraktion von Gemischen unterschiedlich hydrophober Peptide mit Säure verschiedener Konzentration hat sich als sehr einfache Vortrennungsmethode erwiesen. Mit der Verwendung von 10 % Ameisensäure wurde erreicht, daß die Peptide jeweils ausschließlich im Überstand oder im Niederschlag auftraten. Die kleinen Peptide wurden auf einer HPLC RP18-Säule getrennt und mit einem linearen Acetonitrilgradienten (5-50 % in 50 min) eluiert. Das Elutionsprofil ist in Abb.15 zu sehen.

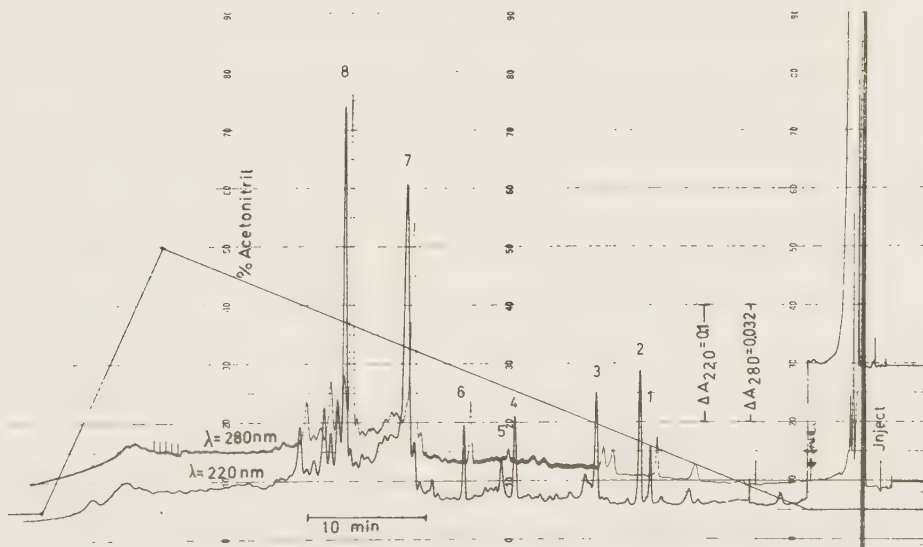


Abb.15 HPLC der in 10 % Ameisensäure löslichen BrCN-Fragmente des Halorhodopsins auf einer RP18 10 μm 50 Å Säule (Merck).

Gegenüber der Methode von Bergmeyer et.al. (1981) zur Auftrennung von BrCN-Peptiden aus BR wurde der "Solvensmodifizier" Ameisensäure (5 %) durch Trifluoressigsäure (TFA, 0.16 %) ersetzt. Dadurch wurde es möglich, Peptide ohne aromatische Aminosäuren bei 220 nm zu detektieren.

Die großen BrCN Peptide wurden in 100 % Ameisensäure gelöst und auf der gleichen HPLC-Säule mit einem linearen 2-Propanolgradienten getrennt (5-95 % in 100 min). Als "Solvensmodifizier" wurde wiederum 0.16 % TFA verwendet. Zwei hydrophobe Peptide eluieren bei 68 bzw. 82 % Propanol.

Die HPLC-Auftrennung hat den großen Vorteil, daß sie zu Peptiden führte, die direkt sequenziert werden konnten. Die Ausbeuten hydrophober Peptide sind aber außerordentlich schlecht und lagen bei den HR-Peptiden bei 5-20 %. Da in Flüssigphase sequenziert wurde, wurden kürzere hydrophobe Peptide teilweise ausgewaschen. Auf Grund der daraus resultierenden kleinen Mengen konnten bisher nur Sequenzen bis zu max. 22 Aminosäuren erhalten werden.

Um die Peptidausbeuten zu erhöhen, wurden auch HPLC-Säulen mit größerem Porendurchmesser (Bakerbond C18, 5 µm, 300 Å; Chrompack Vydac TPRP 300 Å) ausprobiert, die angeblich bessere Ausbeuten an hydrophoben Peptiden ermöglichen sollen. Auch Säulen mit unpolarerer Belegung wurden verwendet (Merck Lichrospher CH-8, 10 nm, 500 Å). Die Ausbeuten ließen sich jedoch mit keiner dieser Säulen verbessern. Injektion der Proben in 1 % SDS führte zu einer Ausbeuteverbesserung bei den hydrophilen Peptiden, hatte aber ebenfalls eine beträchtliche "Peakverbreiterung" zur

Folge. Die Elution mit sehr flachen Acetonitrilgradienten (0.2 %/min) verbesserte in einigen Fällen die Trennung, aber nicht die Ausbeute. Aus den Ergebnissen kann geschlossen werden, daß die schlechte Löslichkeit der Peptide in den Eluenten der entscheidende Faktor für die Ausbeute ist. In Abb.16 sind die gefundenen Teilsequenzen aufgeführt.

Anfangssequenzen der in 10 % Ameisensäure löslichen Peptide:

1. (Met)-Lys-Tyr-Gly-Gly-Asp-Tyr-Gly-Glu-Met
 1 2 2 4 4 2 2 4 2 1
2. (Asp)-Pro-Ala-Gly-His-Ala-Leu-Ala-Gly-Glu-Met
 4 4 4 2 4 6 4 4 2 1
3. His-Gly-Glu-Ser-Pro-Val-Asn-Glu-Asn-Glu-Ala-Thr-Val-Glu-Gly-Gly-
 Lys-Ser-Lys-Val-Ile-Pro-Ala-Pro-Glu-Gly-Glu-Ala-Pro- X -
 Ala-Thr-Gly-Gly-Pro-Val-
6. (Met)-Leu-Asn-His-Val-Tyr-
 1 6 2 2 4 2
7. (Met)-Gly-Arg-Thr-Ile-Arg-Pro-Gly-Arg-Pro-Arg-Leu-Ile-
 1 4 3 3 1 3 3 4 3 3 3 3 1
 Trp-Gly-Ala-Thr-Leu-
 1 4 4 3 6
8. (Met)-Val-Arg-Ser-Glu- X -Gly-Arg-Tyr-Leu-
 1 4 3 2 1 4 3 2 6

Anfangssequenz des in 100 % Ameisensäure löslichen Peptids:

10. (Met)-Met-Gly-Phe-Leu-Pro-Gly-Ile-X-Ala-Leu-Val-Ser-
 1 1 4 1 6 3 4 3 4 6 4 2
 Phe-Val-Val-Ala-Ala-Ile-Pro-Val-Ile-Lys-Tyr-
 1 4 4 4 4 1 3 4 1 2 2

Abb.16 Die gefundenen Teilsequenzen des Halorhodopsins. Die Zahlen unter den Peptiden geben den Entartungsgrad für die jeweilige Aminosäure an, wie er im Halobakteriengenom gefunden wurde.

Die kurzen Peptide 1+2. konnten vollständig sequenziert werden. Die Aminosäureanalysen bestätigen die Sequenz. Peptid 2 beginnt mit Prolin und resultiert möglicherweise aus einer Säurespaltung (Asp-Pro-Spaltung). Gipfel 3 (Abb.15) enthält zwei Sequenzen, die parallel sequenziert wurden. Weiterhin zeigt die Aminosäureanalyse dieser Fraktion ein Äquivalent Cysteinsäure, die wahrscheinlich durch Oxidation eines Cysteins während der Spaltung entsteht (Gross,1967). Peptid 9 ist blockiert und konnte nicht sequenziert werden. Es enthält vermutlich den N-Terminus des HR. Das extrem hydrophobe Peptid 10 enthält 20 ungeladene Aminosäuren hintereinander und ist vermutlich ein durch die Membran reichender HR-Teil. Die Teilsequenzen in Abb.16 enthalten 103 Aminosäuren, die 45 % der Gesamtsequenz des HR ausmachen, wenn von 230 Aminosäuren für das HR ausgegangen wird.

Auffällig an Peptid 7 sind vier Arginine im Abstand von 3-4 Aminosäuren. Diese würden in einer α -Helix ungefähr übereinander liegen. Die positiv geladene Guanidiniumgruppe dient im aktiven Zentrum vieler Enzyme zur Erkennung negativ geladener Substrate und anionischer Cofaktoren (Schneider, 1978). Im HR könnten die Arginine an Chloridbindung und -transport beteiligt sein und sind daher von besonderem Interesse. Drei Anionenbindungsstellen verschiedener Spezifitäten sind bereits nachgewiesen und näher charakterisiert worden (Steiner et.al.,1984; Falke et.al.,1984).

Die gefundenen Teilsequenzen des HR wurden mit den

bekannten Sequenzen des Rinderrhodopsins (365 AS, Ovchinnikov, 1982), des Bakteriorhodopsins (248 AS, Khorana et.al., 1979) und des Schafrhodopsins (101 AS bekannt) verglichen. Für diesen Zweck wurde ein "Alignment Score Programm" (Orcutt et.al., 1982) verwendet, das mit Hilfe der Dayhoffschen Mutationsmatrix (Dayhoff et.al., 1979) über Mutationswahrscheinlichkeiten die Verwandtschaft zweier Proteine bzw. Peptide berechnet. Die einzige signifikante Homologie wurde zwischen dem HR-Peptid 7 (Abb.16) und dem Anfang der BR-Sequenz gefunden:

<Glu-Ala-Glu-Ile-Thr	Gly-Arg-Pro	Glu-Trp	Ile-Trp	Leu-Ala	BR
-Gly-Arg-Thr-Ile-Arg-Pro	Gly-Arg-Pro	Arg-Leu	Ile-Trp	Gly-Ala	HR

Als die komplette Sequenz des Rinderrhodopsins bekannt wurde (Ovchinnikov et.al., 1982), war verwunderlich, daß diese keinerlei Homologie zur BR Sequenz aufweist, obwohl die Chromophoreigenschaften beider Proteine viele Ähnlichkeiten zeigen. Wie die Arbeiten von Schobert und Lanyi (1982, 1983), die Arbeiten von Steiner u.a. (1984) und die eigenen Ergebnisse gezeigt haben (siehe unten), stimmen die Chromophore von HR und BR in noch viel stärkerem Maße überein. Obgleich beide Proteine im gleichen Organismus vorkommen, zeigen die bisher gefundenen HR-Teilsequenzen geringe Homologie zum BR. Daraus kann geschlossen werden, daß derjenige Teilbereich der Proteinsequenz, der für die Chromophorstruktur verantwortlich ist, offenbar sehr begrenzt ist und nur wenige Aminosäuren, möglicherweise nur eine oder zwei, mit dem Retinal elektronisch und sterisch wechselwirken (Sheves & Nakanishi, 1983). Für BR wurde

gezeigt, daß bei der Rekonstitution des Chromophors aus dem Apoprotein und Retinal drei Gruppen mit pK-Werten von 3,8, 4,5 und >10,5 beteiligt sind. Energieübertragung findet über ein Tryptophan statt (Schreckenbach et.al.,1978 I+II). Nakanishi et.al. vermuten aufgrund von Rekonstitutionsversuchen mit Retinalanalogen eine negative Ladung im 3 Å Abstand von der Schiffischen Base und eine weitere in 3,5 Å Abstand vom C5-Atom des Retinals (Nakanishi et.al.,1981).

Die Zahlen unter den Peptiden in Abb.16 stehen für den Entartungsgrad des genetischen Codes für die einzelnen Aminosäuren. Zur Zeit werden die 32 möglichen Nukleotide synthetisiert, die die Aminosäureteilsequenz Asp-Tyr-Gly-Glu-Met von Peptid 1 kodieren können (Oesterhelt und Gärtner, persönliche Mitteilung). Der genetische Code für alle anderen aus 5 Aminosäuren bestehenden Teilsequenzen hat einen noch größeren Entartungsgrad. Die Nukleotide sollen als Hybridisierungsprobe sowohl bei der Koloniehybridisierung mit einer Genbank des gesamten Halobakteriengenoms in dem Vektor pBR 322 dienen (Vogelsang-Wenke und Blanck, pers. Mitteilung) als auch als Primer bei der c-DNA Synthese an der Halobakterien m-RNA eingesetzt werden (Gärtner und Oesterhelt, pers. Mitteilung).

3.2.4 Jodosobenzoesäurespaltung und Isolierung des Hauptfragments

Für die chemische Spaltung hinter Tryptophanresten wurden verschiedene Reagenzien beschrieben wie zum Beispiel Jodosobenzoesäure (Mahony et.al.,1981), N-Bromsuccinimid (Patchornik et.al.,1960), DMSO/HCl+BrCN (Huang,H.V.et.al., 1983), BNPS-Skatole (Fontana et.al.,1973), Chlorsuccinimid (Lischwe & Sung,1977). Alle diese Reaktionen erreichen weder die guten Spaltungsausbeuten noch die Spezifität, die durch die BrCN-Spaltung hinter Met erreicht wird. In dieser Arbeit wurde das wohl am besten untersuchte Reagenz Jodosobenzoesäure für die Tryptophanspaltung verwendet. Um die Nebenreaktion mit Tyrosinresten zu vermeiden, wurde das Reagenz mit p-Kresol vorinkubiert. Der Effekt des p-Kresols ist nicht darauf zurückzuführen, daß die in geringen Konzentrationen auftretenden Mengen an Jodoxybenzoesäure entfernt werden (Mahony et.al.,1981). Neuere Untersuchungen haben ergeben, daß das p-Kresol die halogenierenden Agenzien aus der Lösung abfängt und damit die Modifizierung und Spaltung von Tyrosinresten verhindert (Fontana et.al.,1983). Mit diesem vorinkubierten Reagenz wurde das detergentzfreie HR in Gegenwart von 4M Guanidiniumhydrochlorid in 88 % Ameisensäure 24 h inkubiert. (Um reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen sollten nur Reagenzien bester Qualität verwendet werden). Danach wurde die Reaktionsmischung durch Gelfiltration aufgetrennt. Als Trennmateriel wurde ein Hydroxypropyldextran (Sephadex LH 60, Pharmazia) und als Laufmittel 88 % Ameisensäure/Ethanol (3/7) verwendet. Diese

Bedingungen wurden von Gerber et.al. (1977) eingeführt und haben sich bei der Sequenzierung des BR bewährt.

Da die Tryptophane durch die Spaltungsreaktion zerstört werden, geht die Absorption bei 280 nm zum großen Teil verloren. Andererseits absorbiert der große überschuß an aromatischem Reagenz sehr stark bei 280 nm. Deshalb wurden die Peptide durch Ninhydrinfärbung identifiziert. Das größte Peptid hat die Anfangssequenz (Trp)-Gly-Ala-Thr-Leu- und überlappt damit mit dem BrCN Peptid 7. Damit ist es von großem Interesse für die Aufklärung der HR Aminosäuresequenz. Um längere Sequenzen zu erhalten, müssen die JBS-Peptide noch weiter gereinigt werden. Erste Versuche mit kurzen HPLC-Säulen mit sehr geringer Oberflächenbelegung (Beckmann RPSC 4.5 x 75 mm) haben bereits gute Ausbeuten an gereinigten Peptiden ergeben.

3.2.5 Vergleich der verschiedenen Spaltungsmethoden

Enzymatische Spaltungen von denaturiertem HR haben sich insofern als nachteilig erwiesen, da wegen der geringen HR Löslichkeit in Suspension gespalten werden muß. Um eine annähernd quantitative Spaltung hinter bestimmten Aminosäuren zu erreichen, waren lange Inkubationszeiten notwendig. Deshalb waren die Spaltgemische auch bei Verwendung von spezifischen Enzymen wie V8-Protease, Chymotrypsin oder Trypsin sehr heterogen.

Gute Ansätze für die Sequenzierung haben dagegen enzymatische Spaltungen von nativem, in Detergens gelöstem

HR ergeben. Trotz der hohen Salzkonzentration von 1 M NaCl wurde HR mit Chymotrypsin in zwei große Peptide mit app. Molekulargewichten von 9 und 13 KD gespalten. Beide zeigten jedoch keine einheitlichen N-Termini und mußten weiter gereinigt werden. Dies ist durch HPLC mit einem Elutionssystem in 70 % Ameisensäure gelungen. Da die Peptide jedoch bisher erst in sehr geringen Mengen isoliert wurden, konnten noch keine längeren Sequenzen erhalten werden.

Die Reaktion des HR mit Ameisensäure sollte zu einer selektiven Spaltung der Asp-Pro-Bindungen führen. Auf dem analytischen SDS-Gel waren jedoch keine definierten Bruchstücke zu identifizieren. Das HR enthält offenbar eine Reihe von mehr oder weniger säureempfindlichen Bindungen. Hydroxylamin, das spezifisch zwischen Asn und Gly spaltet (Bernstein und Balian, 1977) greift die HR-Polypeptidkette nicht an. Eine Asn-Gly-Sequenz kommt im HR also nicht vor. Die BrCN-Peptide sind bisher die einzigen Bruchstücke, die längere HR-Sequenzen ergeben haben. Die Tryptophanspaltung mit Jodosobenzoesäure war zwar erfolgreich, die Peptide konnten aber bisher nicht genügend rein in ausreichender Menge isoliert werden. Die Tryptophanspaltung zusammen mit den Spaltungen des nativen HR (Chymotrypsin, Papain, Proteinase K, Trypsin) bietet jedoch Ansatzpunkte, die Sequenz des HR auf der Proteinebene zu vervollständigen.

3.3 Der Halorhodopsinchromophor

3.3.1 Verhältnis der Retinalisomere

Vom Bakteriorhodopsin in der Purpurmembran ist bekannt, daß sein Chromophor aus einem Retinalmolekül besteht, das über eine Schiffische Base an das Apoprotein gebunden ist und mit verschiedenen Aminosäureresten elektronisch und sterisch wechselwirkt (vgl. Kap.:3.2.3.) (Als Chromophore werden Atome oder Atomgruppen bezeichnet, in denen die an der Anregung beteiligten Elektronen lokalisiert sind). Die Absorptionsbande des Retinals (280 nm) geht bei der Rekonstitution des Chromoproteins über verschiedene Zwischenstufen in die Absorptionsbande des BR über (568 nm). Dieser Chromophor existiert in zwei interkonvertierbaren Formen (Oesterhelt and Stoeckenius, 1971). Im Dunkeln gehalten zeigt er ein Absorptionsmaximum bei 560 nm und wird als dunkeladaptiertes BR (BR_{0A}) bezeichnet. Belichtung verursacht eine Rotverschiebung von 10 nm und eine Zunahme der Absorption um 12 %. Diese Form wird als lichtadaptiertes BR (BR_{LA}) bezeichnet. Im Dunkeln kehrt sie langsam in die BR_{0A} Form zurück. Die Halbwertszeit ist stark temperatur- und pH-abhängig und beträgt bei 26 °C und pH 5 1 h. Sie ist damit um Größenordnungen langsamer als die Lichtadaptation. Der Chromophor des BR_{0A} enthält 50 % 13-cis- und 50 % all-trans- Retinal. BR_{LA} dagegen nur all-trans-Retinal (Oesterhelt et.al, 1973; Sperling et.al. 1977).

Beide BR-Formen, cis-BR und trans-BR vollziehen zyklische Photoreaktionen. Lichtadaptation entsteht dadurch, daß eines der cis-BR Photozyklusintermediate thermisch in zwei verschiedene Produkte zerfällt, von denen eines ein Intermediat des trans-Zyklus ist (Sperling et.al.1977).

Wird dunkeladaptiertes HR in 1 % OG, 1 M NaCl 1 min lang bestrahlt, verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 575 nm nach 579 nm, und die Absorption nimmt um 6 % zu (Abb.17).

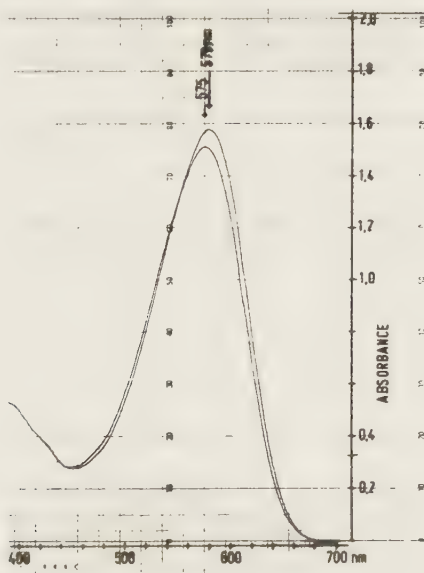


Abb.17 Absorptionsspektren von dunkeladaptiertem (λ_{max} : 575 nm) und lichtadaptiertem (λ_{max} : 579 nm) Halorhodopsin.

Wie im BR werden also auch im HR zwei unterscheidbare Formen beobachtet, eine dunkeladaptierte HR-Form (HR_{DA}) und eine lichtadaptierte HR-Form (HR_{LA}). Das Differenzspektrum Abb.18 zeigt den größten Absorptionsunterschied bei 600 nm.

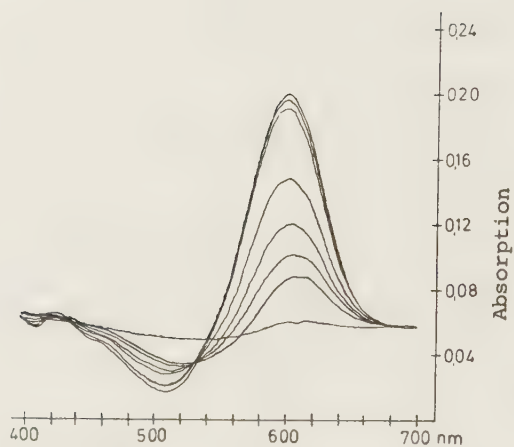


Abb.18 Differenzspektren von licht- und dunkeladaptiertem HR in 1 M NaCl, 1 % OG 2 min, 25, 45, 65, 75, 82 und 110 h nach Belichtung.

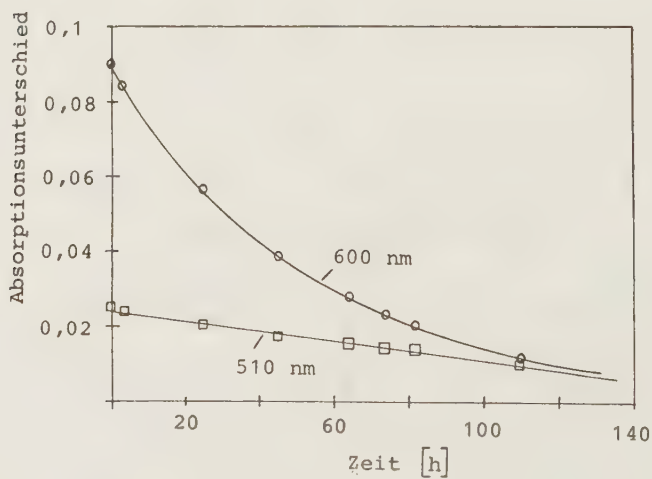


Abb.19 Zeitlicher Verlauf der Absorptionsdifferenzen bei 600 und 510 nm.

Im Dunkeln bildet sich die HR_{DA} Form nur sehr langsam zurück (Abb.19). Die Halbwertszeit bei 22 °C und PH 7 liegt bei 36 Stunden.

Das Absorptionsmaximum des gereinigten HR wird von Steiner und Oesterhelt (1983) mit 580 ± 2 nm und von Taylor u.a.(1983) mit 575 nm angegeben. Die Differenz ist durch die beiden Formen HR_{LA} und HR_{DA} zu erklären. Wird das freie Octylglycosid durch Dialyse entfernt, so liegt das Absorptionsmaximum des HR bei 572 nm, das sich durch Belichtung nicht bathochrom verschieben läßt.

Aufgrund der beobachteten Licht-Dunkel-Adaptation wurden die Retinalisomere aus verschiedenen HR-Proben extrahiert (nach Gärtner et.al.1983) und die Zusammensetzung hochdruckflüssigkeitschromatographisch bestimmt. In Abb.20 sind die Isomerenverhältnisse in verschiedenen HR Proben angegeben. In allen gelösten HR und BR Proben tritt neben den 13-cis und all-trans- Isomeren auch 9-cis-Retinal auf. Bei länger belichteten Proben ist der 9-cis-Anteil höher. Bisher ist nicht eindeutig geklärt, ob das HR in gelöster Form monomer, dimer oder höher aggregiert vorliegt (Steiner,1983). Werden Membranfraktionen extrahiert, tritt sehr viel weniger 9-cis-Retinal auf. Die Membranfraktionen sind offenbar weniger anfällig für unspezifische Retinalisomerisierung. Um die Möglichkeit, daß 9-cis-Retinal in BR oder HR Funktion vermittelt, zu testen, wurden Retinal- und BR-negative Zellvesikel (L-07) mit 9-cis Retinal rekonstituiert. Im Vergleich zu all-trans-Retinal ließ sich nur 10 % des HR-Chromophors rekonstituieren und keinerlei Pumpaktivität messen. Damit ist eine Funktion des

9-cis Retinal im HR ausgeschlossen.

Abb.20 Das Verhältnis der Retinalisomeren in verschiedenen HR und BR Proben

	Probe	all-trans	13-cis	9-cis
HR	(DA)			
	1 M NaCl, 1 % OG	75 %	24 %	4 %
	(LA)			
	1 M NaCl, 1 % OG	71 %	23 %	6 %
	410 nm (Photoprodukt)			
	1 M NaCl, 1 % OG	54 %	40 %	6 %
L-33 MFT:	410 nm (Dunkelform)			
	1 M NaCl, 1 % OG	76 %	22 %	2 %
		80 %	19 %	< 1 %
BR:	(DA)			
	1 M NaCl, 1 % OG	75 %	21 %	4 %
	(LA)			
	1 M NaCl, 1 % OG	88 %	9 %	3 %
	PM (DA)	53 %	47 %	< 1 %
	PM (LA)	96 %	4 %	< 1 %

Das Verhältnis von all-trans zu 13-cis ist in gelosten HR Dunkelproben immer ungefähr 3/1, was bedeutet, daß die Licht-Dunkeladaptation im HR nicht wie beim BR auf eine Änderung der Retinalisomerenzusammensetzung zurückzuführen ist.

Aus L-33 Tweenmembranen wurde ebenfalls Retinal extrahiert und ein all-trans/13-cis Verhältnis von 4/1 gefunden. Diese Isomerenzusammensetzung wurde bereits von Ogurusu u.a.(1982) in R₁M₁ Membranfraktionen gefunden. Es muß jedoch berücksichtigt werden, daß aus den L-33 Membranen

die Isomeren aus zwei Pigmenten, HR und SR, die in vergleichbaren Mengen vorliegen, extrahiert werden. Daher läßt sich über die Retinalisomeren Zusammensetzung in membrangebundenem HR wenig sagen. Mutanten, die nur HR und kein SR enthalten, sind bis jetzt noch nicht bekannt.

Im BR ändert sich das Isomerenverhältnis all-trans:13-cis durch Lösen der Purpurmembran in 1 M NaCl, 1 M Octylglycosid von 1:1 nach 3:1 (Abb.20). Bei Belichtung isomerisieren im gelösten BR nur noch 50-60 % des 13-cis Retinals in die all-trans Form anstelle von 90 % in der PM. Die Chromophorverschiebung sinkt von 8-10 auf 4 nm ab. Ähnliche Ergebnisse wurden für das BR von Casadio und Stoeckenius (1980) gefunden, die in Triton X100 monomer gelöstes BR untersucht haben.

Die Unterschiede zwischen membrangebundenem und gelöstem BR zeigen, daß die Eigenschaften von gelöstem HR nicht ohne weiteres auf das HR in der Zellmembran übertragen werden dürfen.

Von den bisher bekannten HR-Photoprodukten konnte nur die HR_{410} -Form extrahiert werden. Dieses Produkt ist kein Intermediat des mit dem Chloridtransport verbundenen Photocyclus sondern eine Seitenreaktion. Durch Zugabe von Azid läßt sich die HR_{410} Form bei Belichtung ($\lambda > 570$ nm) anreichern und bei 4 °C extrahieren. Gegenüber den HR-Dunkelformen wurde ein erhöhter 13-cis Anteil gefunden. Dieses Ergebnis ist ein erster Hinweis dafür, daß im HR-Photocyclus eine all-trans nach 13-cis Isomerisierung auftritt.

3.3.2 Hydroxylaminbleichung

Um den HR Chromophor weiter zu charakterisieren, wurden die gelösten Chromoproteine HR und BR mit 2M Hydroxylamin behandelt. Bei Belichtung wurden die Chromophore in 30 min (HR) bzw. 60 min (BR) vollständig gebleicht. Im Dunkeln wurde keine Reaktion beobachtet (vgl. Steiner, 1983). Es reagieren also nicht die Grundzustände sondern Photoprodukte (beim BR das 412 nm Produkt, vgl. Oesterhelt et.al., 1973).



Abb.21 Dünnschichtchromatogramm der aus gelöstem HR und BR extrahierten Retinaloxime.
 Laufmittel: Petrolether(40-60°)/Methylheptanon (11/2: v/v)

Die entstandenen Retinaloximisomere werden dünnschichtchromatographisch getrennt. In beiden Chromoproteinen entstehen aus dem all-trans- und dem 13-cis-Retinal jeweils beide stereoisomeren Oxime, die syn- und die anti-Formen (Abb.21) (vgl. auch Gödecke, 1976). Die R_f Werte stimmen mit denen von Gößwein (1976) gefundenen überein.

Im BR bilden sich bei der Bleichung kleine Mengen der 11-cis Verbindungen (Abb.21).

Das reaktive Photoprodukt ist im HR ebenso wie im BR von beiden "Seiten" zugänglich und die Reaktion verläuft nicht stereospezifisch. Das 13-cis Isomere reagiert etwas schneller als das all-trans Isomere, sodaß mehr 13-cis Oxime auftreten, obwohl im Chromophor mehr all-trans Retinal vorliegt.

3.3.3 Boranatreduktion

Um ein Peptid zu isolieren, das die Aminosäure enthält, an die das Retinal gebunden ist, muß das Retinylidenprotein durch Reduktion in ein Retinylprotein umgewandelt werden.

Wird natives HR bei 4 °C mit 1 % Boranat inkubiert, so nimmt die Absorption bei 574 nm ab. Es entsteht eine kurzwellige Absorptionsbande mit einem Maximum bei 357 nm und einer dreigipfligen Feinstruktur (Abb.22). Ein dreigipfliges Spektrum wird für Moleküle erwartet, deren freie Drehbarkeit eingeschränkt ist und bei denen dadurch nur ausgewählte π - π^* Übergänge möglich sind (Reppe, 1970).

Das Absorptionsmaximum spricht für eine Struktur mit 5 Doppelbindungen, deren π -Elektronen in einer Ebene liegen und maximal wechselwirken. (Reppe, 1970).

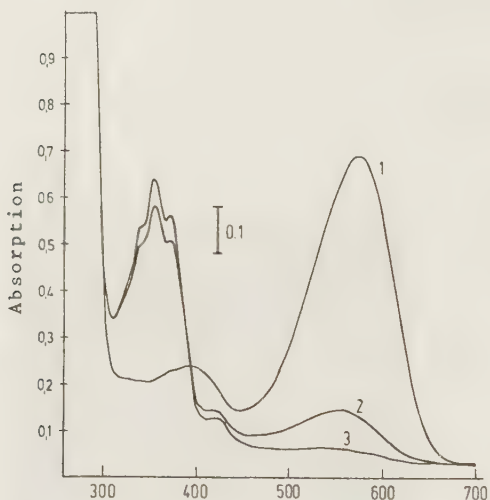
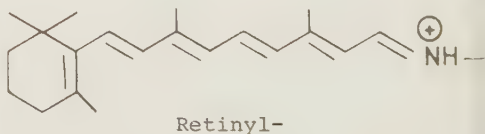
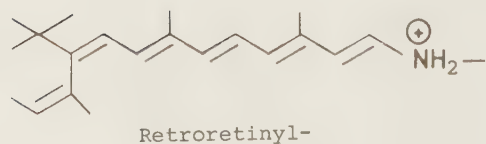


Abb.22 Spektrum von (1) HR vor und (2) 10 min nach Zugabe von Natriumborant (Endkonzentration: 1 %, pH 9.6)

Für die dreigipflige Absorption in Abb.22 kommt eine Retroretinyl- oder eine durch die Proteinumgebung planarisierte A_1 -Retinylverbindung in Frage (vgl. Schreckebach et.al., 1977):



Der Absorptionskoeffizient kann jedoch abgeschätzt werden, da bekannt ist, dass die Ketinylspezies nach Zugabe von 10 % Ethanol in eine einfache Absorptionsbande mit einem Maximum bei 324 nm übergeht.

Es liegt also eine Ketinylverbindung vor, deren π -System durch die Proteinumgebung in einer Ebene gehalten wird. Durch Denaturierung des Proteins wird die freie Drehbarkeit des Cyclohexenringes wieder hergestellt, und die normale Absorptionsbande von Ketinylverbindungen in Lösung entsteht.

Die Geschwindigkeit der Boranatreduktion ist stark vom pH-Wert, Detergens und Licht abhängig. Ohne Pufferung der Lösung steigt der pH bei Zugabe von Boranat auf 11,8. Das RP wird im Dunkeln bei 4 °C komplett reduziert. Durch Belichtung wird die Reaktion um ca. Faktor 1000 beschleunigt. Wie bei der Hydroxylierungsreaktion reagiert eines der Photoprodukte schneller als der Grundzustand. Die Lichtreaktion bei pH 11,8 führt jedoch nicht zu einer planarisierten Ketinylspezies (Abb.23).

Abb.23 Reduktion mit 1 % Natriumboranat

	Salzkonzentrationen	pH	Licht	t1/2	max [nm]	Konformation
HR:	2 M NaCl	11.8	-	15 min	357	planar
			+	< 1 sec	325	nicht planar
	2 M NaCl 1 M NH_4HCO_3	9.8	-	2-3 h	357	planar
			+	10 min	357	planar
	1 M NaCl 1 % OG	9.6	-	10 min	357	planar
			+	10 sec	357	planar
	2 M NaCl	11.8	-	2 h	325	nicht planar
			+	10 min	325	"
BR:	2 M NaCl 1 M NH_4HCO_3	9.8	-	-	325	"
			+	30 min	325	"
	1 M NaCl 1 % OG	9.6	-	-	325	"
			+	30 min	325	"

In Gegenwart von 1 M Ammoniumhydrogencarbonat steigt der pH-Wert nicht über 9,8. Die Reduktion wird stark verlangsamt. Der Einfluß auf die Lichtreaktion ist jedoch sehr viel stärker als auf die Dunkelreaktion. Dieses ist ein weiteres Argument dafür, daß mit und ohne Licht zwei unterschiedliche Chromophorspezies reduziert werden.

In Gegenwart von Octylglycosid stellt sich ein pH von 9,6 ein, da die Borsäure durch das Detergens abgepuffert wird. Das HR reagiert jedoch in Detergens um den Faktor 10-100 schneller als ohne Detergens bei gleichem pH. Der Retinylrest bleibt planarisiert.

Die Kontrollen mit BR zeigen, daß in Octylglycosid gelöstes BR langsamer als HR reagiert und im Gegensatz zur Reduktion in der PM keine planare Retinylverbindung entsteht (vgl. Abb. 23. Schreckenbach et.al., 1977).

3.4 Antikörper gegen Halorhodopsin

Die mit den Anreicherungsverfahren I+II erreichte elektrophoretische Reinheit des HR machen es möglich, spezifische polyklonale Antikörper gegen BR und HR zu bekommen. Dieses wurde durch ein Standardimmunisierungsprogramm und Injektion der reinen Proteine in Kaninchen erreicht.

Für die Bildung von BR-Antikörpern wurde durch Apatit und präp. SDS-PAGE gereinigtes BR verwendet. Für Antikörper gegen einbandiges HR wurde HR aus L-07 Zellen (Meth.I) und für Antikörper gegen zweibandiges HR wurde HR aus L-33 Zellen (Meth.II) verwendet.

Der Titer der Antikörper erlaubte eine Serumverdünnung von 1:25 bis 1:50 für BR und einbandiges HR und 1:250 für zweibandiges HR im Test.

Im ersten Test wurden Tritium markiertes BR und HR (L-07) je zweimal nebeneinander von der SDS-PAGE elektrophoretisch auf Nitrozellulose transferiert (Towbin et.al., 1979). Das Gel wurde mit Coomassie G250 angefärbt und zeigte, daß nur ein kleiner Teil der beiden hydrophoben Proteine übertragen

worden war (Abb.24). Auch, durch längere Transferzeit und durch Arbeiten in 1 % SDS-Lösung ließ sich nicht mehr Protein auf die Nitrozellulose übertragen.

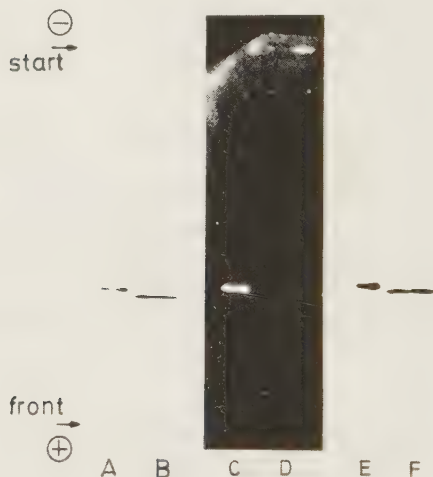


Abb.24

Immunologische Unterscheidung zwischen HR und BR

A+B: Coomassie Anfärbung von BR (A) und einbandigem HR (B)
 C+D: Fluoreszenz auf Nitrozellulose nach Transfer vom Gel, inkubiert mit BR-Kaninchen Antiserum und Fluorescein markiertem anti Kaninchen IgG von der Ziege. Beachte, daß D keine Fluoreszenz zeigt.
 E+F: Fluorographie der [^3H]-RP nach Transfer auf Nitrozellulose.

Das erste Paar (BR und HR) auf dem Filterpapier wurde mit Antikörpern gegen BR oder HR inkubiert, die dann mit Fluoresceamin markierten α -Hase-IgG aus Ziege sichtbar gemacht wurden. Das zweite Paar wurde auf einem Röntgenfilm

exponiert um zu zeigen, daß etwa gleich viel BR und HR übertragen wurde. Wie in Abb.24 zu sehen, reagieren BR-Antikörper nicht mit HR. Ebenso reagieren HR-Antikörper nicht mit BR. Die bei der Produktion dieser Antikörper exponierten Determinanten von BR und HR sind also verschieden, das heißt jedoch nicht, daß keine gemeinsamen Sequenzbereiche vorliegen können.

Antikörper gegen zweibandiges HR wurden dazu verwendet, um in verschiedenen BR negativen Mutanten zu untersuchen, ob beide HR Banden vorhanden sind oder nicht. Von den untersuchten Stämmen (L-07, L-33, Flx3, Flx37) fehlt nur in dem Retinal-negativen L-07 Stamm die untere Bande völlig. Deshalb liegt die Vermutung nahe, daß für das Auftreten der unteren HR-Bande die Fähigkeit der Zelle zur Retinalsynthese notwendig ist. Die Flx3 Mutante zeigt keine HR-Pumpaktivität, aber trotzdem beide HR-Proteinbanden. Dieser Stamm enthält entweder ein Haloopsin, das Retinal nicht binden kann, oder eine Mutation führt zu einer 20 KD Proteinspezies ohne HR-Pumpaktivität aber mit starken HR Homologien.

Beide HR-Antikörper reagieren außer mit dem HR noch mit einem weiteren Protein der Gesamtmembranfraktionen. Dieses Protein hat ein app. Molekulargewicht von ca. 30 KD und ist bereits dadurch aufgefallen, daß die Pulsmarkierung mit [³⁵S]-Methionin parallel mit der HR-Synthese verläuft. Um eine mögliche Verwandtschaft dieses Proteins mit dem HR zu überprüfen, wurde nativ isoliertes HR elektrophoretisch nachgereinigt und zur Immunisierung verwendet. Die so entstandenen Antikörper reagierten bei einer 1:10 Verdünnung

nicht mehr mit dem 30 KD Protein sondern ausschließlich mit dem HR.

Diese Antikörper finden bei der Mutantenselektionierung und bei der Suche nach dem HO-Gen in Vektoren mit starken Promotoren Anwendung (Vogelsang-Wenke, pers.Mitteilung).

Immunisierungsversuche mit nativem HR ergaben keine brauchbaren Antikörper.

3.5 Halorhodopsininduktion

3.5.1 Vergleich von ein- und zweibandigem Halorhodopsin

Im Abschnitt 3.1. wurden verschiedene Methoden zur HR-Isolierung beschrieben. Neben der Tatsache, daß bei Methode I und II das HR in denaturierter Form und bei Methode III in nativer Form erhalten wurde, führte die Anreicherung aus Retinal-negativen Stämmen (BO^- , HO^+ , SO^+ , Ret^-) wie L-07 immer zu einem Retinylprotein, das im SDS-Gel als scharfe Einzelbande mit einem apparenten Molekulargewicht von 20 KD wandert. Im Gegensatz hierzu führte die Isolierung aus Retinal-positiven Zellen (BO^- , HO^+ , SO^- , Ret^+) unabhängig vom Anreicherungsverfahren zu einer Doppelbande mit apparenten Molekulargewichten von 20 und 19 KD. Um mit diesen gereinigten Produkten proteinchemische Untersuchungen oder Funktionsstudien durchführen zu können, sollte geklärt werden, ob beide im Gel auftretenden Banden die gleiche Proteinspezies mit nur sehr geringen Unterschieden beinhalten, oder ob beide unterschiedliche möglicherweise nur entfernt verwandte Proteine darstellen.

Im Halobakteriengenom treten hohe Mutationsraten auf und eine Vielzahl von Mutanten stehen zur Verfügung. Da es bisher nicht gelungen ist, einen Zelltyp zu isolieren, der kein SR, sondern HR als einziges Retinylprotein enthält, bestand die wichtigste Aufgabe darin, die Anwesenheit von SR in den gereinigten Produkten auszuschließen.

Um die Identität von HR und SR mit den Proteinbanden bei

20 und 19 KD überprüfen, zu können, wurden zur näheren Charakterisierung die vier Mutanten L-07, L-33, Flx3, Flx37 ausgewählt (näheren Eigenschaften siehe Material und Methoden), die Unterschiede in ihrer HR und SR Aktivität aufweisen und außer im Molekulargewichtsbereich um 20 KD praktisch keine Unterschiede im Proteinmuster aufweisen. Die auf dem Gel aufgetrennten Membranfraktionen sind in Abb.25 zu sehen.

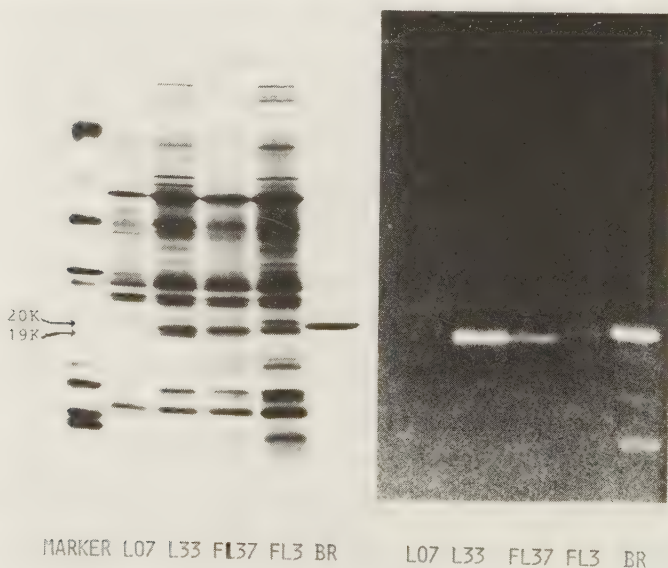


Abb.25 SDS-PAGE tweengewaschener, reduzierter Membranfraktionen bei UV-Bestrahlung (366 nm, Spur E-H) und nach Anfärbung mit Coomassie Blau (A-D).

Nach Anfärbung mit Coomassie Blau wurden die Bandenintensitäten densitometrisch bestimmt und ihre relativen Mengen durch Vergleich mit der Intensität der in allen untersuchten

Halobakterienstämmen vorkommenden Bande bei 30 KD verglichen.

Die HR-Aktivität wurde durch Messen des durch Entkoppler verstärkten Protonenausstroms bestimmt. Um die Aktivität der vier verschiedenen Stämme vergleichen zu können, muß dieser Test in Vesikeln durchgeführt werden, da die HR-Aktivität im Retinal-negativen Stamm L-07 vor dem Test durch Zugabe von Retinal rekonstituiert werden muß, was nur in Vesikeln, nicht aber in ganzen Zellen möglich ist (Hegemann et.al., 1982).

Spudich et.al. (1983) haben durch Blitzlichtphotolyse-experimente gezeigt, daß die HR-Aktivität in Retinal-negativen Stämmen ansteigt, wenn den Zellen während des Wachstums exogenes Retinal zugegeben wird. Der SR-Gehalt sollte sich durch Zugabe von Retinal nicht ändern. Die in allen untersuchten Stämmen vorkommende 20 KD Bande wurde als SR bezeichnet und die 19 KD Bande als HR.

Um die Beobachtung der Induktion zu berücksichtigen wurden mit exogenem all-trans Retinal gewachsene L-07 Zellen (L-07R) in den Vergleich der Proteinbanden um 20 KD mit einbezogen. Die auf dem SDS-Gel aufgetrennten tweengewaschenen Membranfraktionen aus L-07 und L-07R wurden mit L-33 verglichen (Abb.26), da L-07 aus L-33 selektioniert wurde und die Membranen dieser Stämme den besten Vergleich der Retinalproteine erlauben (Wagner et.al. 1982).

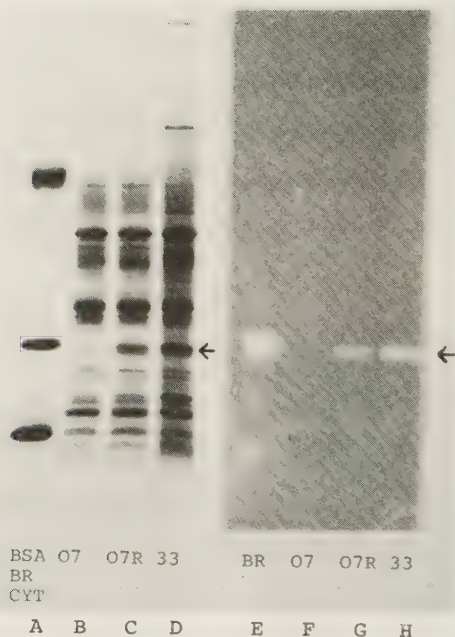


Abb.26 SDS-PAGE tweengewaschener, reduzierter Membranfraktionen bei UV-Bestrahlung (366 nm, Spur E-H) und nach Anfärbung mit Coomassie Blau (A-D). In der folgenden Tabelle werden die Bandenintensitäten bei 20 und 19 KD mit den HR-Pumpaktivitäten quantitativ verglichen.

Stamm		L-07	L-07R	L-33	Flx37	Flx3
HR-Pumpaktivität:		12 %	95 %	100 %	40 %	<2 %
Banden-	20 KD:	10	60	60	40	30
intensität						
im SDS-Gel:	19 KD:	0	40	40	10	<5

In L-07, L-07R, L-33 und Flx3 lassen sich die Pumpaktivitäten mit der Summe der Bandenintensitäten bei 19 und 20 KD gut korrelieren. Dies ist der erste Hinweis dafür, daß beide Banden mit der HR-Aktivität verbunden sind. Durch Zugabe von Retinal während des Wachstums werden beide Banden bis auf

das Niveau in L-33 induziert. 19 und 20 KD nehmen ebenso wie die Pumpaktivität um Faktor 10 zu (vgl. Abb. 26 und Tabelle). Unter der Annahme, daß der Slow Rhodopsingehalt der Zellen durch Zugabe von Retinal während des Wachstums nicht verändert wird, ist also keine der beiden Banden mit SR identisch. In Flx3 läßt sich die Bandenintensität bei 20 KD nicht mit der HR-Pumpaktivität korrelieren. Deshalb besteht bei diesem Stamm die Möglichkeit, daß bei 20 KD Material ohne HR-Aktivität vorliegt.

Die Induktion beider Proteine mit Retinal im L-07 Stamm weist aber trotzdem darauf hin, daß beide Proteine die Fähigkeit besitzen, Retinal zu binden. Um zu beweisen, daß Retinylproteine vorliegen, wurden alle vier Stämme mit Natriumborhydrid inkubiert um vorhandene Retinylidenproteine zu Retinylproteine zu reduzieren. Abb. 25b zeigt die Fluoreszenz der aufgetrennten Membranfraktionen. Fluoreszenz ist ausschließlich im Molekulargewichtsbereich von 20 KD zu finden. Die Intensität stimmt bei allen vier Stämmen gut mit den gefundenen HR-Aktivitäten überein. L-07 Membranen zeigen nach Reduktion nur eine sehr schwache Fluoreszenz, die in Abb. 25b nicht zu sehen ist. Vor dem Auftragen auf das Gel ist sie jedoch gut nachweisbar. Die Zuordnung der Fluoreszenz zur 20 oder 19 KD Bande ist in Abb. 25b nicht möglich, da die Auflösung des Gels nicht ausreicht. In Abb. 25 ist es jedoch gelungen zu zeigen, daß die Fluoreszenz in den Membranen aus L-07R und L-33 zu annähernd gleichen Anteilen auf beide Banden verteilt ist. Flx3 zeigt in Übereinstimmung zur fehlenden HR-Aktivität keine Fluoreszenz. In Flx3 ist die Proteinbande bei 20 KD entweder kein HR oder das

Apoprotein hat Aufgrund bestimmter Veränderungen die Fähigkeit verloren, Retinal zu binden. Bei dieser Interpretation sollte man bedenken, daß L-07 und Flx37 aus L-33 selektioniert wurden, Flx3 dagegen aus S90. Flx3 weist zu den anderen Stämmen einen relativ geringeren "Verwandtschaftsgrad" auf als diese untereinander.

Worin sich die beiden HR-Banden unterscheiden, konnte bisher nicht geklärt werden. Eine partielle unspezifische Proteolyse kann ausgeschlossen werden, da das Verhältnis der beiden Banden und der Unterschied im apparenten Molekulargewicht während der Aufarbeitung vom Gesamtlysat bis zum gereinigten Endprodukt unverändert bleibt. Limitierte Proteolyse mit V8-Protease hat gezeigt, daß die Spaltmuster bei Verwendung von ein oder zweibandigem HR gleich sind. Eine Erklärung für die unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit im SDS-Gel wäre eine Modifizierung des Halorhodopsins während des Wachstums. Diese könnte in einer Methylierung, Glycosylierung, Desamidierung oder ähnlichem bestehen. Damit bestünde kein wesentlicher Molekulargewichtsunterschied, sondern veränderte Ladungsverhältnisse könnten zu dem beobachteten unterschiedlichen Verhalten auf dem SDS-Gel führen.

Auf Grund dieser Versuche ist es verständlich, daß das aus L-33 Zellen angereicherte HR (nach Meth. II oder III) zwei Banden zeigt, die wie in den Membranfraktionen im Verhältnis 60 zu 40 auftreten (20 KD / 19 KD).

Von Lanyi et.al. (1983) wurde auf Grund von Blitzlicht-photolyseexperimenten berichtet, daß L-33 Zellen

vergleichbare Mengen an HR und SR enthalten. Durch die oben beschriebenen Experimente wurde gezeigt, daß das Molekulargewicht des SR, wenn dieses in vergleichbaren Mengen wie HR in der Zelle vorkommt, nicht bei 20 KD liegen kann. Da einerseits die in der Zelle vorkommenden Konzentrationen an SR bei allen untersuchten Stämmen nahezu gleich war andererseits die SR-Aktivität durch Auflösen der Membranfraktion zerstört wird, ist es bisher nicht gelungen, das Molekulargewicht des SR zu bestimmen. Bei der Betrachtung der relativen Anteile an HR und SR in der Zelle sollte jedoch folgendes berücksichtigt werden. Wenn nach Anregung durch einen Blitz die gebildeten Photozyklusintermediate von HR und SR Absorptionsmaxima haben, die verschieden weit vom Grundzustand (λ_{max} bei 580 nm für beide Chromoproteine) entfernt liegen, so treten bei gleicher Konzentration unterschiedliche Ausbleichamplituden auf. Für HR liegt das langlebigste Intermediat bei 520 nm und überlappt stark mit dem Grundzustand, das letzte Photoprodukt des SR liegt jedoch bei 373 nm und überlappt nicht mit dem Grundzustand. Deshalb führt ein direkter Rückschluss von den Ausbleichamplituden auf die relativen Konzentrationen in der Zelle zu einer relativen Unterbestimmung des HR-Gehaltes. Ein weiteres Problem beim quantitativen HR:SR-Vergleich ist die Verzweigung des HR-Photocyclus in Richtung HR_{410} (vgl. Kap 3.8). Dieses Produkt wird bei jedem Zyklus zu 2 % gebildet und zerfällt in 50 sec. Bei längerer Bestrahlung der Kuvette mit dem Messlicht wird HR_{410} angereichert und dadurch ein geringerer HR-Anteil vorgetäuscht als tatsächlich vorhanden.

3.5.2 Einfluß von Retinal auf die Biosynthese des HR

Eine Analyse der Zunahme der HO-Biosynthese bei Zugabe von Retinal während des Wachstums ist in Abb.27 dargestellt.

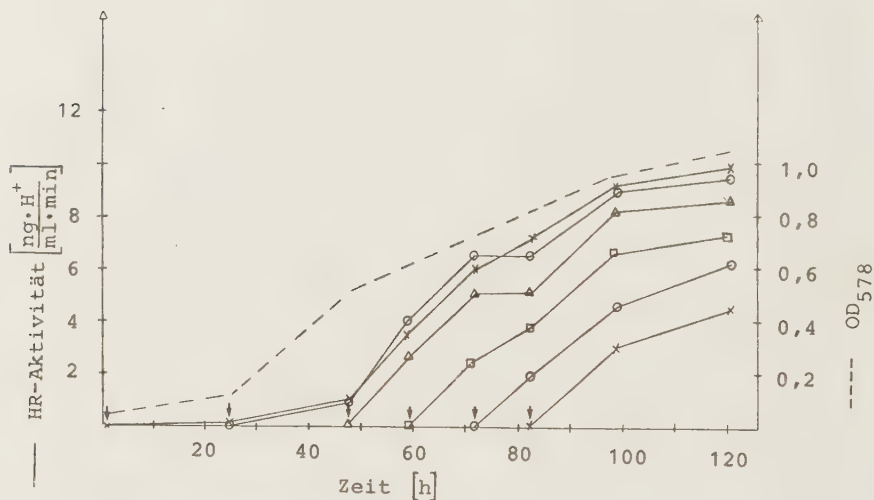


Abb.27 Zugabe von exogenem Retinal zu Retinal negativen Halobakterienkulturen (L-07) zu verschiedenen Zeiten. Die Pfeile markieren den Zeitpunkt der ersten Retinalzugabe. Die unterbrochene Linie stellt den Verlauf der Zelldichten, gemessen als Lichtstreuung bei 578 nm dar.

Die HR-Volumenaktivität in den Kulturen ist aufgetragen gegen die Wachstumszeit. Sechs verschiedene Kulturen wurden verfolgt. Die Pfeile geben die erste Retinalzugabe an. Werden zu verschiedenen Zeiten Proben entnommen und die Membranfraktionen auf dem SDS-Gel aufgetrennt, so korrelieren die Bandenintensitäten bei 20 und 19 KD nach

Coomassieanfarbung mit den Aktivitätsmessungen. Nach Zugabe von Retinal lässt sich HR-Aktivität nachweisen, wenn die Zelle durch den Sauerstoffmangel kompetent für die Synthese geworden ist (30-40 h). Die Zeit bis zur HR-Induktion entspricht der bis zur BR-Induktion in S9 Zellen (Hegemann et.al., 1983, Oesterhelt & Stoeckenius, 1973). Die Geschwindigkeit der HR-Synthese, gemessen als Aktivitätszunahme, ist in einem bestimmten Zeitintervall in allen Kulturen gleich (80-100 h) und nimmt auch bei weiterer Erhöhung der Retinalkonzentrationen in keinem Falle zu. Sie ist damit unabhängig vom Zeitpunkt der ersten Retinalzugabe und damit ebenfalls unabhängig von der bereits gebildeten Menge an HR (vgl. Kultur 1 und 6). Die Kompetenz der Zelle für die HR-Synthese hängt also nur vom Sauerstoffpartialdruck in der Kultur ab. Die Beobachtung, daß die HR-Synthese in Abwesenheit von Retinal stark reduziert ist, kann auf der Basis eines Modells, das vor einiger Zeit für die BR-Synthese von Sumper und Herrmann (1976) vorgeschlagen wurde, verstanden werden. Das Apoprotein Haloopsin unterdrückt seine eigene Biosynthese und kann nur weiter gebildet werden, wenn Haloopsin zum Halorhodopsin rekonstituiert wird. Die Rekonstitution ist aber offenbar nur in wachsenden Zellen möglich. "Alte" Zellen können nicht mehr zur Haloopsin Synthese angeregt werden, da sonst die Syntheserate bei erstmaliger Retinalzugabe zu einem späten Zeitpunkt überproportional ansteigen sollte. Retinal induziert also nicht die HO-Synthese, sondern verhindert ihre Inhibierung.

3.6 Rekonstitution der Halorhodopsinaktivität an Schwarzen Lipidmembranen

3.6.1 Anlagerungen von Membranfraktionen

a) Entstehung transienter Photoströme

Die sauberste und konzentrierteste Form von membrangebundenem HR ist die Tween-gewaschene Membran (MFT), die aus den BR-negativen Stämmen L-33 und OD2 erhalten wird. Elektronenmikroskopische Aufnahmen haben gezeigt, daß offene Membranfragmente mit einer Größe von 50 bis 100 nm vorliegen. Werden diese Membranfraktionen zu einer Seite der Schwarzen Membran gegeben, entsteht keine Photoempfindlichkeit im Kurzschlußexperiment, wenn die Elektrolytlosung nur 100 mM Natriumsulfat enthält (Abb.28A). Nach Zugabe kleiner Mengen Chlorid (6 mM) entsteht ein transienter Photostrom (Abb.28B). Kontrollexperimente wurden mit zwei anderen Membranfraktionen durchgeführt. 1. Zellmembranen derselben Stämme, die nicht mit Detergens behandelt wurden, zeigten dieselben chloridabhängigen Photoantworten wie die MFT aber mit halben maximalen Photoströmen. 2. wurde BR in Form von Purpurmbran zu den schwarzen Membranen zugegeben. BR erzeugte bei Belichtung in Abwesenheit von Chlorid die bekannten Photoströme (Abb.28C, vgl. Bamberg et.al.,1979), die nach Chloridzugabe nicht wesentlich zunahmen (Abb.28D). Der maximale transiente Strom war in Gegenwart von BR 10 mal

größer als der, der mit der HR-haltigen MFT erhalten wurde und hatte das umgekehrte Vorzeichen.

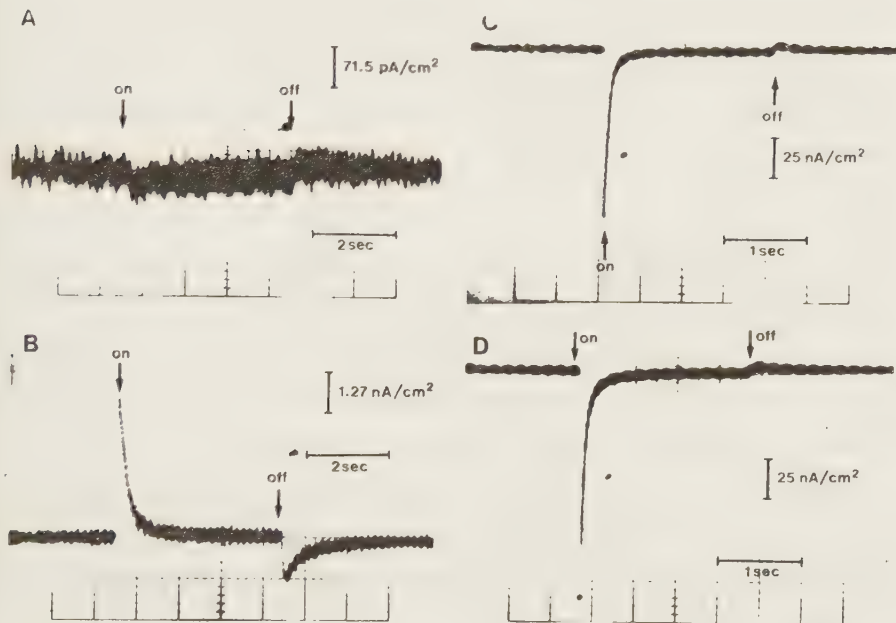


Abb.28 Kurzschlußströme nach Zugabe von HR haltigen Membranen (1 mg) aus L-33 Zellen zu einem wässrigen Kompartiment (6 ml) in 0,1 M Na_2SO_4 (A) und 0,1 M Na_2SO_4 , 6 mM NaCl (B). C und D zeigen die entsprechenden Experimente mit BR enthaltender Purpurmbran (1 mg) aus S9 Zellen in Gegenwart von 0,1 M Na_2SO_4 (C) und 0,1 M Na_2SO_4 , 6 mM NaCl (D). Die sättigende Lichtintensität (weißes Licht, $\lambda > 300$ nm) war 5 mW/cm^2 .

Der Größenunterschied der Photoströme beruht sehr wahrscheinlich nur auf den geringen Konzentrationsunter-

schieden von HR in der MFT und BR in der Purpurmembran (PM), wobei ähnliche Frequenzen der Photozyklen vorausgesetzt werden können (Lozier et.al.,1975; Weber and Bogomolni, 1981). Dies wird durch den Vergleich von Tween-gewaschenen Membranen verschiedener HR Stämme bestätigt, wobei die verschiedenen HR-Konzentrationen proportional zu den maximalen Photoströmen waren. Die OD2 MFT ergab ein doppelt so großes Signal wie die L-33 MFT; spektroskopische Messungen ergaben ebenfalls einen zwei mal größeren HR Gehalt.

Das Aktionsspektrum des HR Spitzenstroms und das HR Differenzspektrum werden in Abb.29 verglichen. Die Übereinstimmung beider Spektren identifiziert zweifellos einen Retinal-Protein-Chromophor als die photochemisch aktive Species. Die Tween-gewaschenen Membranen aus L-33 Zellen enthalten jedoch zwei Retinalproteine, Halorhodopsin und Slow Rhodopsin (Steiner,1983). HR-negative und SR-positive Stämme sind verfügbar. Die Membranen dieser Stämme können als geeignete Kontrollen verwendet werden. HR-freie Tweenmembranen eines solchen Stammes (Flx3, Spudich and Spudich, 1982) wurden getestet und keine Photoantwort erhalten. Dies bedeutet, daß SR photoelektrisch inaktiv und HR die elektrogene Spezies in L-33 und OD2 Zellen ist.

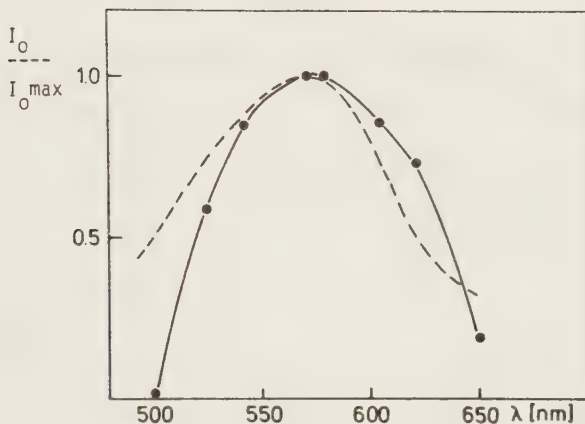


Abb.29 Vergleich des Absorptionsspektrums des HR-Photostroms I_0 mit dem Absorptionsdifferenzspektrum von HR in L-33 Tweenmembran (unterbrochene Linie, ausgeführt mit ungebleichten und gebleichten Membranen). Beide Kurven wurden normalisiert. Das Aktionsspektrum wurde auf gleiche Quantenflußdichte normalisiert.

In Abb.30, wo die reziproken Werte von I_0 (extrapolierter Strom zur Zeit $t=0$) als Funktion der reziproken Lichtintensität aufgetragen sind, ist ersichtlich, daß der Photostrom mit ansteigender Lichtintensität sättigt.

Das Verhalten kann mit Gleichung (1) beschrieben werden:

$$I_0 = I_0^* \frac{J}{J + J_{1/2}} \quad (1)$$

I_0 ist der Sättigungsstrom und $J_{1/2}$ die Halbsättigungsintensität von annähernd $2,5 \text{ mW/cm}^2$.

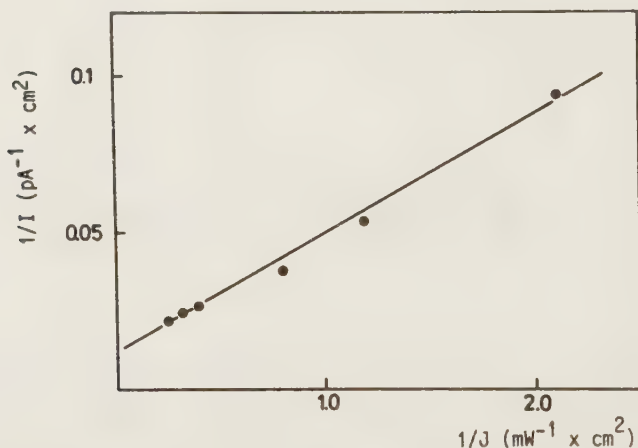


Abb.30 Reziproke Werte des Anfangsstromes I_0 wurden als Funktion der reziproken Lichtintensität J aufgetragen. Die Lichtintensität wurde mit einer Serie kalibrierter Graufilter variiert. Alle Messungen wurden an der gleichen schwarzen Membran ausgeführt.

Die beobachteten Photoströme entsprechen der Tatsache, daß die MFT durch Adsorption an die darunter liegende schwarze Membran mit dieser eine Sandwich-ähnliche Struktur bildet. Die Tween-gewaschene Membran ist nicht in die schwarze Membran integriert (Bamberg et.al,1981). Das Auftreten der transienten Photoströme legt eine Anordnung wie in Abb.31A nahe. Das Verhalten dieser Sandwich-ähnlichen

Struktur kann durch ein entsprechendes Ersatzschaltbild (Abb.31B) beschrieben werden (Bamberg et.al.,1979; Herrmann and Rayfield,1978).

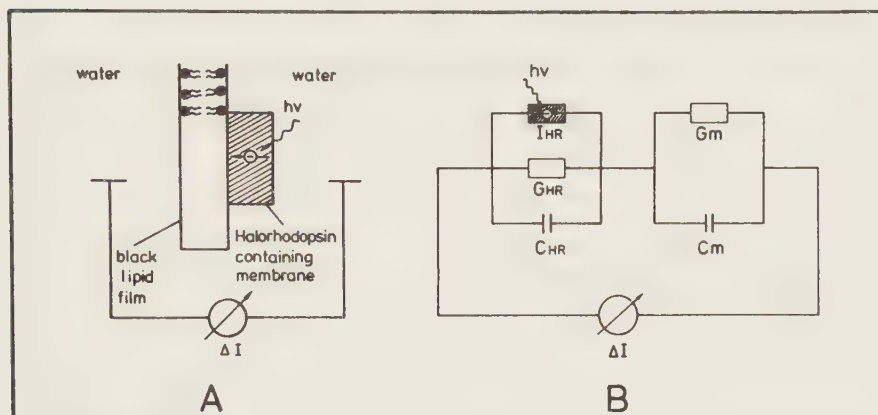


Abb.31

A: Schematische Darstellung der Membrananordnung .

B: Ersatzschaltbild des Membransystems in Abb.31A. G_{HR} und C_{HR} sind die Leitfähigkeit und die Kapazität der HR enthaltenden Membran (G_{HR} schließt die Beiträge der Leckströme zwischen MFT und schwarzer Membran ein). G_m und C_m sind die Leitfähigkeit und die Kapazität der darunterliegenden schwarzen Membran. I_{HR} ist der durch HR produzierte Photostrom. I_s ist der extern gemessene Kurzschlußstrom.

Die photoelektrischen Phänomene der BR enthaltenden PM sind zufriedenstellend mit einer einfachen Stromkreisanalyse beschrieben worden (Bamberg et.al.,1979), die auch auf die HR enthaltende Tweenmembran anwendbar ist:

Die transienten Photostrome in Abb.28B sind auf einen Pumpstrom I_{HR} zurückzuführen, der die Membrankapazitäten C_{HR} und C_m gemäß der folgenden Gleichung (2) (Bamberg et.al.,1979) auflädt:

$$I_0 = I_{HR0} \frac{C_a}{C_a + C_{HR}} \quad (2)$$

I_{HR0} ist der Anfangspumpstrom.

Bei konstanter Chloridkonzentration (8 mM) hängt die Abklingzeit des Photostroms von der Intensität des Anregungslichtes ab. Die Abklingzeit beträgt 5 sec bei niedrigen Lichtintensitäten (1 mW/cm²) und nimmt bis auf einen konstanten Wert von 0.1 sec bei sättigenden Lichtintensitäten (6 mW/cm²) ab. Diese Ergebnisse stimmen mit dem entsprechenden Ersatzschaltbild in Abb.31B überein, in dem die reziproke Zerfallszeit des Photostroms proportional zum Pumpenstrom I und damit auch zur Lichtintensität sein sollte (Bamberg et.al.,1979).

Die HR-Konzentration in der L-33 MFT ist ungefähr 5-10 % der des BR in der PM aus S9 Zellen. Wie erwartet zeigen die entsprechenden Photostrome ein ähnliches Verhältnis (Abb.28B+D).

Die Abklingzeit des Photostroms ist 10 msec für BR (S9) und 100 msec für HR (L-33 MFT). Der reziproke Wert der Zerfallszeit ist proportional zum gemessenen Photostrom in BR oder in HR entsprechend folgender Gleichung:

$$\tau = \frac{C_m + C_{HR}}{G_m + G_{HR} + I_{HR0} / V^*} \quad (3)$$

V^* ist eine Konstante und I_{HR} ist proportional zum gemessenen Photostrom I_s . Der 10fach kleinere Wert, der beim BR gegenüber HR gefunden wird, stimmt gut mit der 10 bis 20 fachen Konzentration und dem 10 mal größeren Photostrom in Abb.28 überein.

Unter experimentellen Bedingungen sind C_m , C_{HR} , G_m , G_{HR} konstant, wohingegen sich I_{HR} mit der Lichtintensität ändert und größer als G_{HR} und G_m sein muß (vgl. die Abhängigkeit von I_s von der Lichtintensität in Abb.29).

Die entgegengesetzten Vorzeichen der durch BR und HR induzierten Ströme in Abb.28 sind folgendermaßen zu erklären: In ganzen Zellen erzeugen beide Chromoproteine bei Lichtanregung ein Ansteigen des Membranpotentials (innen negativ), da BR Protonen aus der Zelle heraus und HR Chlorid in die Zelle hinein pumpt. Für BR entspricht das Vorzeichen des Photostroms einem Protonentransport in Richtung der BR-freien Seite und für HR einem Chloridtransport in Richtung MFT-freier Seite (vgl. Abb.31A). Dies bedeutet eine bevorzugte Bindung der extrazellulären Seite der PM und eine bevorzugte Bindung der intrazellulären Oberfläche der MFT an die schwarze Membran.

Abb.28B+D zeigt die Rückkehr zum Dunkelzustand für HR als transientes Signal mit umgekehrtem Vorzeichen. (Ausschalt-

effekt oder off-response), wie man es auf Grund des Ersatzschaltbildes in Abb.31B erwartet. Ein viel kleinerer Ausschalteffekt wurde für BR beobachtet (Abb.28C+D). Eine Abschätzung der Protonenmenge, die durch BR in den Raum zwischen PM und schwarzer Membran gepumpt wird, erlaubt den Schluß, daß eine große pH-Änderung die Wechselwirkung der beiden Oberflächen verändert und die elektrische kapazitive Kopplung verringert. Dies erklärt den kleinen Ausschalteffekt für BR. HR andererseits pumpt Chlorid oder andere Halogenidionen in den Zwischenraum von Tween gewaschener Membran und schwarzer Lipidmembran. Diese Ionen verursachen weniger Störung der Wechselwirkung beider Membranen während der Lichtperiode. So zeigt sich eine größere Entladung der Kapazitäten als Ausschaltsignal.

b) Ionenspezifität

Wie bereits in Abb.28 gezeigt, ist für die Photoantwort des HRs die Gegenwart von Chlorid erforderlich, während BR unabhängig von Chlorid ist.

Die Abhängigkeit des Photostroms I , von der Chloridkonzentration bei konstanten Lichtintensitäten zeigt Abb.32A. Diese kann durch einen Michaelis-Menten-Formalismus (4) beschrieben werden:

$$\frac{1}{I} = \frac{1}{I_{\max}} \cdot \left(1 + \frac{K_s}{C_{Cl}} \right) \quad (4)$$

Ein K_s Wert von 8 mM für Chlorid wurde beim HR in Tween-gewaschenen Membranen aus L-33 Stämmen bestimmt. Neben Chlorid induzieren noch andere Anionen einen HR-Photostrom. Jodid und Bromid sind mit halbsättigenden Konzentrationen von 5 mM (für Jodid) und 3 mM für Bromid noch effizienter als Chlorid (Abb.32B). Der maximale Photostrom $I_{\max}$ ist für alle drei Ionen nahezu der gleiche (5 nA/cm²), fällt aber bei höheren Konzentrationen für Bromid aus unbekannten Gründen wieder ab. Keine Photoantwort wurde in Gegenwart von Fluorid, Azid oder Sulfat (0-200 mM) erhalten. Nitrat (100 mM) und Azid (200 mM) inhibieren die Chlorid-abhängige Photoantwort um 70-80 % (bei 8 mM Chlorid) und sind deshalb von Interesse bei der Untersuchung der Halogenidbindungsstelle. Variation der Kationen (Na⁺, K⁺, Mg²⁺) hat keinen Einfluß auf die Photoantwort des HRs. Eine ähnliche

Ionenspezifität wurde bei Lichtstreuungsmessungen und Blitzlichtphotolyse an Zellvesikeln gefunden. (Schobert and Lanyi, 1982; Schobert et al., 1983).

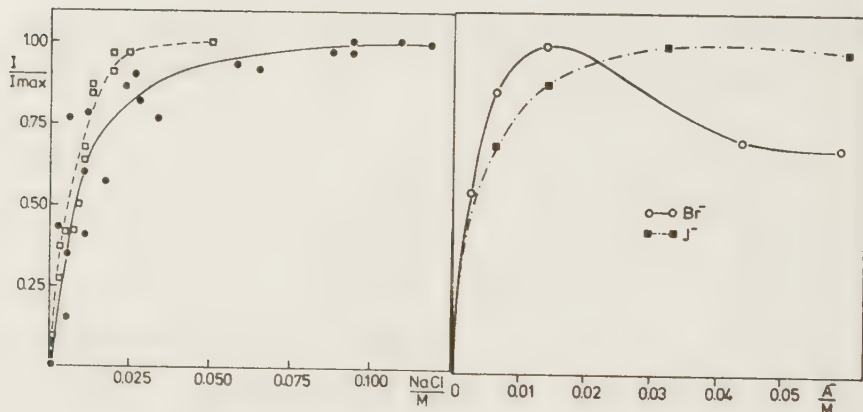


Abb.32 A) Der durch HR induzierte Photostrom als Funktion der Chloridkonzentration. Der Photostrom wurde bei einer Lichtintensität von 5 mW/cm^2 gemessen. Chlorid wurde zu beiden Kompartimenten zugegeben. Silber/Silberchloridelektroden wurden in 10 mM Chlorid gehalten und über chloridfreie Brücken mit den Kuvettenkompartimenten verbunden.

-○- repräsentiert die Ergebnisse aus drei verschiedenen Experimenten mit L-33 Membranen und -●- zeigt die Ergebnisse von einem Experiment mit OD2 Membranen. Der maximale Photostrom bei sättigenden Chloridkonzentrationen I_{max} wurde auf 1 normalisiert (100 mM Na_2SO_4 , PH 7, 0.5 mM Tris-Hepes). B) HR-induzierte Photostrome als Funktion der Bromid- (durchgezogene Linie) und der Jodid- Konzentration (unterbrochene Linie). Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert aus 5 Messungen.

Alle bisher beschriebenen Experimente an schwarzen Membranen wurden in 100 bis 150 mM Sulfat durchgeführt. Unterhalb dieser Konzentration nimmt die chloridabhängige Photoantwort ab und ist unter 10 mM gleich null auch in Gegenwart von 8 mM Chlorid. Dieser Effekt kann als direkter Einfluß der Ionenstärke auf die Aktivität des Proteins erklärt werden, da zusätzliches Chlorid die Photoantwort wieder entstehen läßt. Nicht nur kleine Sulfatkonzentrationen unter 10 mM, sondern auch Konzentrationen über 200 mM verkleinern die Photoantwort. Eine geringere Bindung der MFT an die positiv geladene schwarze Membran kann die Ursache sein.

c) Stationäre Ströme

Der endgültige Beweis, daß HR als elektrogene Pumpe fungiert, kann nicht alleine aus transienten Photostromen abgeleitet werden, denn es ist noch möglich, daß die Transienten durch eine chlorid-aktivierte Ladungsverschiebung während der Belichtung hervorgerufen werden. Die Funktion als Pumpe kann jedoch zweifelsfrei anhand stationärer Ströme bei Dauerbelichtung bewiesen werden. Diese können erreicht werden, indem die schwarze Membran für diejenigen Ionen durchlässig gemacht wird, die durch HR transportiert werden. Abb.33 zeigt ein Experiment, in dem stationäre Photostrome in Gegenwart des Cl^-/OH^- Austauschers Triphenylzinn (TPT, 10^{-6} M) zusammen mit dem Protonenleiter FCCP (10^{-6} M) erhalten wurden.

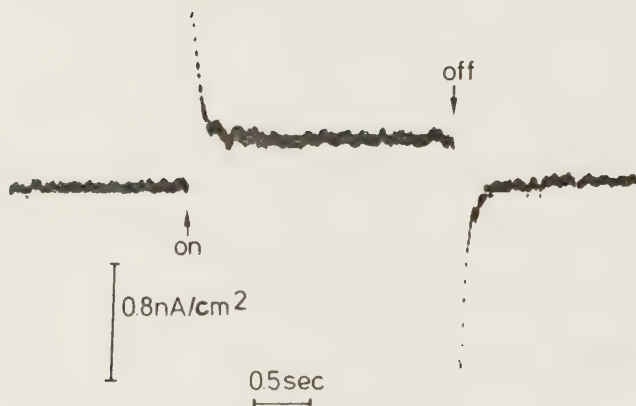


Abb.33 Stationärer Photostrom in Gegenwart von HR. 10^{-6} M TPT und 10^{-6} M FCCP wurden zu beiden Seiten des Membransystems gegeben. Die Dunkelleitfähigkeit der Membran nach Zugabe der Ionophore war 5 nS/cm^2 . $10 \text{ mM Na}_2\text{SO}_4$, 40 mM NaCl pH 6.0, $0.5 \text{ mM Tris-Hepes}$, Lichtintensität 5 mW/cm^2 weißes Licht.

Das Auftreten stationärer Ströme in Gegenwart von TPT und FCCP wird verständlich durch das Schema in Abb.34:

1) HR pumpt Chloridionen in den Raum zwischen Tweenmembran und schwarzer Membran und erzeugt einen elektrochemischen Gradienten (innen negativ).

2) In Gegenwart des Protonophores FCCP können Protonen elektrophoretisch in diesen Zwischenraum nachgezogen werden. Es werden jedoch noch keine stationären Ströme beobachtet, weil durch diese Ionenbewegung Protonen- und Chloridgradienten aufgebaut werden (der Zwischenraum hat ein sehr kleines Volumen).

3) Durch Zugabe des Cl^-/OH^- Austauschers TPT können sich

diese Ionengradienten nicht aufbauen und ein ständiger Chloridfluß, der als stationärer Photostrom meßbar ist, wird möglich.

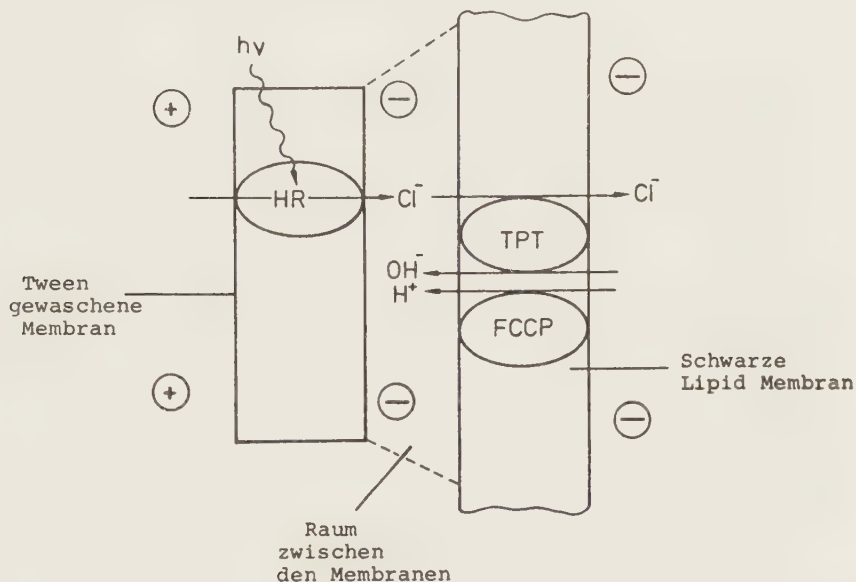


Abb.34 Schematische Darstellung der Ionenbewegung im Membransystem (MFT + schwarze Membran) in Gegenwart des Entkopplers FCCP und des Cl^-/OH^- Austauschers Triphenylzinn.

Verbindungen wie Nystatin und Amphotericin, die Anionenkanäle bilden, und Gramacidin A, das Kationenkanäle bildet, ergaben keine meßbaren stationären Photostrome. Im Fall von Nystatin und Amphotericin B war die Fluktuation des Dunkelstromes (durch kleine Elektrodenasymmetrien verursacht) zu groß, um die erwarteten kleinen Photostrome messen zu können.

Andere Arbeiten haben ebenfalls gezeigt, daß Chlorid

verschiedene Einflüsse auf das HR hat (Ogurusu,et.al.,1982; Steiner and Oesterheit,1983; Steiner et.al.,1983). Chlorid beeinflusst nicht nur das Absorptionsmaximum des Chromophors, sondern stabilisiert diesen auch und ändert das photochemische Verhalten. In Abwesenheit von Chlorid wurde ein schneller Photozyklus (Halbwertszeit 1 msec) mit dem langlebigsten Intermediat bei 640 nm gefunden (Abb.4). Dieser sogenannte Niedrigsalzzyklus zeigt keine Transportaktivität in Zellvesikeln. Nach Zugabe von Chlorid wurde ein langsamerer Photozyklus (Halbwertszeit 10 msec) mit einem bei 520 nm absorbierenden Intermediat gefunden. Dieser Zyklus vermittelt den Chloridtransport. Die elektrischen Messungen an den schwarzen Membranen zeigen klar, daß der Niedrigsalz-Zyklus des HR (bei Abwesenheit von Halogeniden) keine photoelektrische Aktivität hat.

Mit diesen Experimenten wurde an einem künstlichen System gezeigt, daß Halorhodopsin eine elektrogene Anionenpumpe mit einer Spezifität für Halogenide ist. Chlorid ist unter physiologischen Bedingungen das weitaus dominierende Halogenid und es ist deshalb sinnvoll, HR als lichtgetriebene Chloridpumpe zu bezeichnen. Weiterhin ist der Vorteil der Schwarzen Membranen gegenüber Vesikel- oder Liposomensystemen die direkte und empfindliche Messung des primären elektrischen Ereignisses.

Die Frage, ob die Funktion des HR von einer einzigen Proteinspezies oder einem Proteinkomplex ausgeübt wird, kann durch diese Experimente an intakten Membranen nicht beantwortet werden. Dazu muß das isolierte native

Chromoprotein an künstlichen Systemen getestet werden.

3.6.2 Anlagerung von Halorhodopsinvesikeln

Durch die elektrischen Messungen mit Tween-gewaschenen Membranen an schwarzen Lipidmembranen konnte gezeigt werden, daß Halorhodopsin als lichtgetriebene Chloridpumpe fungiert. Da die verwendeten Membranfragmente außer HR noch viele andere Proteine enthalten, konnte nicht eindeutig entschieden werden, ob das Chromoprotein des Halorhodopsins selber die Chloridpumpe ist. Es besteht nämlich die Möglichkeit, daß die funktionelle Einheit des HR aus dem Chromoprotein und einem weiteren Protein besteht. Die Isolierung des reinen Chromoproteins bot die Möglichkeit, zwischen diesen beiden Alternativen zu unterscheiden.

Deshalb wurde die Chloridpumpaktivität zuerst wie in Zellen oder Zellvesikeln durch passiven Protonenausstrom gemessen. Hierfür wurde das gereinigte Chromoprotein in artifizielle Asolectinvesikel inkorporiert und bei Belichtung eine geringe Ansäuerung der Liposomensuspension beobachtet. Diese konnte jedoch durch Zugabe von Protonencarriern (z.B. FCCP) nicht verstärkt werden und entsprach nicht mehr als einem Proton pro Chromoproteinmolekül. Deshalb kann diese Ansäuerung auf zwei Arten erklärt werden. Entweder sind die Vesikel sehr durchlässig für Chloridionen und Protonen oder Protonen werden bei Belichtung aus dem Protein freigesetzt. Obwohl die pH-Änderungen nach Zugabe von lipophilen Ionen leicht

abnahm, was für eine Pumpaktivität spricht, wurde der direkte Beweis der Pumpaktivität durch elektrische Messungen an schwarzen Lipidmembranen vorgezogen.

Als direkteste Methode wurde gereinigtes HR (8 nMol in 100 μ l) in 1 % OG, 1 M NaCl zu einer Seite der schwarzen Membran gegeben. Die Endkonzentration des Proteins in der Kuvette war 1,3 nMol/ml in 1 M NaCl, 0,16 % OG. Es wurde ein kleiner transienter Photostrom beobachtet (0,2-0,3 nA/cm² Spitzenstrom), der für eine preferentielle orientierte Assoziation des Proteins mit der schwarzen Lipidmembran spricht. Wenn einzelne Moleküle mit der Membran assoziieren, kann der kleine Strom darauf zurückzuführen sein, daß große Leckströme auftreten und/oder die Vorzugsorientierung nur sehr klein ist. Die Möglichkeit, daß HR-Moleküle in die Lipidmembran eingebaut werden, kann ausgeschlossen werden, da keine stationären Photoströme auftreten.

Unglücklicherweise wurde die Lipidmembran unter diesen Bedingungen sehr instabil. Kontrollexperimente haben gezeigt, daß diese Destabilisierung nicht auf das Octylglucosid zurückzuführen ist, da Detergentskonzentrationen bis zu 0,5 % die Stabilität der Lipidmembran nicht beeinflussen. Möglicherweise hat das Protein selbst auf Grund seines hydrophoben Charakters die Tendenz, in die Lipidmembran einzudringen und zerstört diese dabei.

Um diesen Nachteil der Instabilität zu vermeiden, wurde das HR in einer lipidgebundenen Form zur schwarzen Lipidmembran zugegeben. Hierfür wurden Asolectinliposomen bereitet und diese zwei Stunden lang mit HR inkubiert. Die

entstandenen Proteoliposomen wurden zu einer Seite einer negativ geladenen Asolectin Lipidmembran gegeben. Die wässrige Lösung enthielt 1 M NaCl und 20 μM CaCl_2 . Photoempfindlichkeit entstand innerhalb von Minuten und nahm innerhalb einiger Stunden noch weiter zu. Abb.35 zeigt den Photostrom 30 min nach Zugabe der Proteoliposomen.

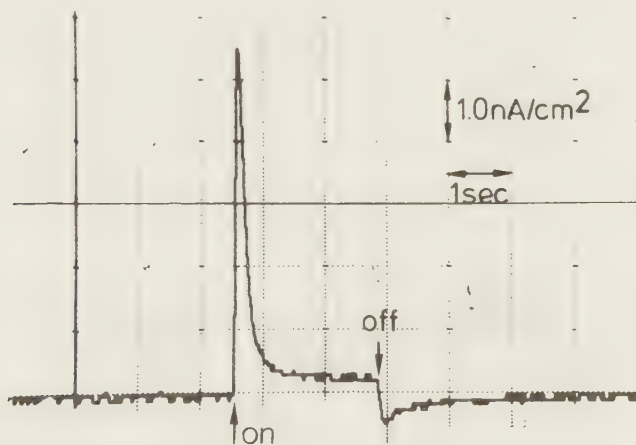


Abb.35 Kurzschlußphotostrom nach Zugabe von 100 μl einer Halorhodopsin enthaltenden Asolectinvesikelsuspension. Proteinendkonzentration 13 nM, Elektrolyt 1 M NaCl, 0,1 mM HEPES pH 6,5, Lichtintensität 5 mW/cm².

Obwohl nur 1 % der HR-Menge verglichen zu dem Experiment mit gelöstem HR verwendet wurde, wurde ein 20mal größerer Photostrom I_s von 5,5 nA/cm² beobachtet. Wie in Abb.35 zu sehen, ist der Photostrom im wesentlichen transient und kann durch eine Assoziation der negativ geladenen Vesikel an die Lipidmembran erklärt werden.

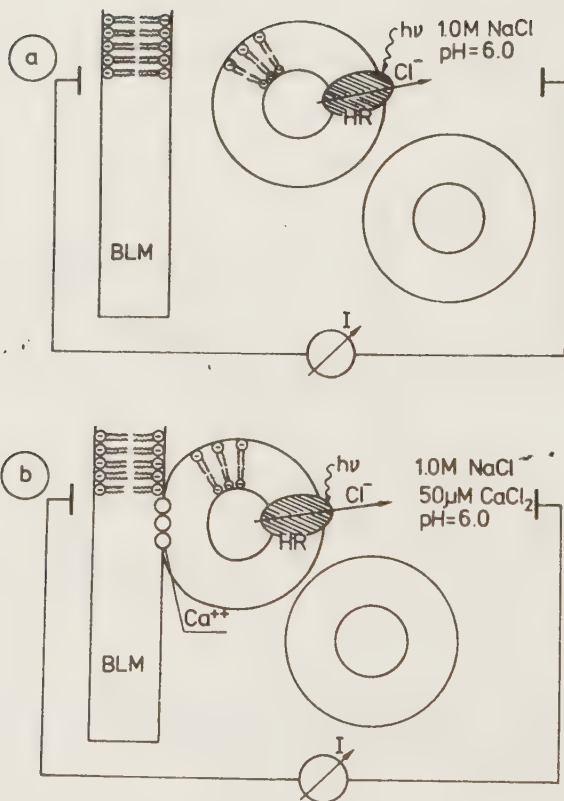


Abb.36 Schematische Darstellung der Adsorption von Asolectinvesikeln an die schwarze Lipidmembran.
 a) keine Adsorption in der Abwesenheit von Ca^{2+} Ionen.
 b) Adsorption der Vesikel an die Membran

Abb.36 erklärt schematisch die Assoziation der Lipidvesikel, die zu einer elektrischen Kopplung zwischen den Proteoliposomen und der Lipidmembran führt. Der kapazitive Zerfall des Photostroms kann ebenso wie bei den Experimenten mit Tween-gewaschenen Membranen mit dem Ersatzschaltbild in Abb.31b erklärt werden. Ähnliche Ergebnisse wurden mit positiv geladenen Membranen, die Octadecylamin enthalten, erreicht. In diesen Fällen waren zur Assoziation der Proteoliposomen keine Kalziumionen notwendig.

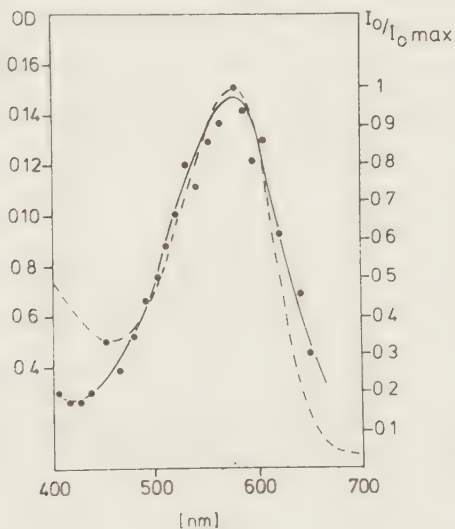


Abb.37

Aktionsspektrum des Spitzenstroms I_0 , gemessen mit einer Serie Schmalbandinterferenz, (13 nM Halorhodopsin). I_{0max} repräsentiert den Photostrom bei 578 nm. Korrekturfaktoren, die das Emissionsspektrum der Lampe und die Transmission der Filter berücksichtigen, wurden durch Kalibrierung mit einem Bolometer erhalten. Die Punkte sind Photostrommessungen. Die unterbrochene Linie repräsentiert das Absorptionsspektrum der HR-enhaltenden Lipidvesikel.

Das Aktionsspektrum des Spitzenstroms und das Absorptionsspektrum der HR-enthaltenden Proteoliposomen wurden im sichtbaren Bereich verglichen (Abb. 37). Die Maxima liegen beide bei 578 nm und damit sehr nahe dem Absorptionsmaximum des lichtadaptierten HR in Lösung.

Bei den Versuchen mit Tween-gewaschener Membran wurde gezeigt, daß die Photoantwort spezifisch von der Chloridionenkonzentration (Halbsättigung 8 mM) abhängt und eine Photoantwort schon unterhalb 1 mM Chlorid meßbar ist. Im Gegensatz hierzu wurde mit HR-Liposomen selbst bei hohen Ionenstärken (1 M Na_2SO_4) keine Photoantwort unterhalb 50 mM Chlorid erhalten. Deshalb war die Bestimmung einer Affinitätskonstanten für Chlorid nicht möglich. Eine Abhängigkeit von verschiedenen Kationen (Na^+ , Mg^{2+} , K^+) wurde nicht gefunden.

Die transienten Ströme geben noch keinen sicheren Beweis dafür, daß das Protein als eine Ionenpumpe fungiert, da solche Ströme auch durch eine lichtinduzierte einmalige Ladungsbewegung innerhalb des Proteins zustande kommen können. Deshalb können nur über einen längeren Zeitraum transportierte Ladungen, die sich als stationärer Strom äußern, eindeutig zeigen, daß eine Ionenpumpe vorliegt (vgl. vorheriges Kap.).

Im Falle der lichtgetriebenen Protonenpumpe Bakteriorhodopsin haben Proteoliposomen stabile stationäre Photoströme an schwarzen Lipidmembranen gezeigt, nachdem diese durch Zugabe von lipophilen Entkopplern wie z.B. FCCP permeabel für Protonen gemacht wurden (Herrmann & Rayfield, 1978).

Für analoge Experimente mit HR ist kein geeigneter Entkoppler verfügbar. Deshalb wurde das lipophile Anion Tetraphenylborat ($\text{T}\Phi\text{B}^-$) verwendet, um stationäre Photostrome zu bekommen. Abb.38 zeigt einen stationären Photostrom, nachdem die wässrige Phase des Proteoliposomen-Membransystems mit $0,1-1 \mu\text{M}$ $\text{T}\Phi\text{B}^-$ aquilibriert wurde.

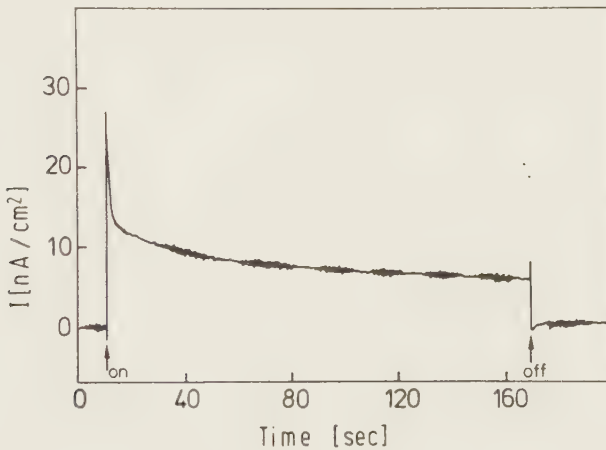
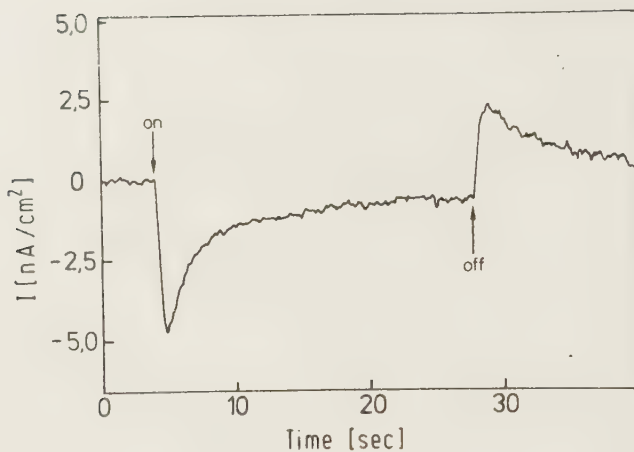


Abb.38 Stationärer Photostrom, induziert durch HR enthaltende Asolectinvesikel (13 nM Halorhodopsin) in Gegenwart von $1 \mu\text{M}$ $\text{T}\Phi\text{B}^-$, 1 M NaCl und 0,1 mM HEPES pH 6,5. Lichtintensität $10 \text{ mW}/\text{cm}^2$, positiv geladene Membran.

Der Photostrom nimmt nach dem anfänglichen kapazitiven transienten Anteil langsam im Minutenbereich ab und ist damit nur quasi stationär. Diese Abnahme deutet auf die Bildung von Konzentrationsgradienten von $\text{T}\Phi\text{B}^-$ und Chlorid hin, die von der Pumpaktivität des Chlorid herrühren. Eine schematische Abbildung der Ionenbewegung zeigt die Abb.39.

nach innen gepumpt wird. Um gute elektrische Adsorption an die Lipidmembran zu erreichen, wurden die Zellvesikel langsam durch Verdünnen mit Wasser von 4 M auf 1 M NaCl gebracht. Die Zugabe dieser Zellvesikel zur Lipidmembran ergab jedoch keinen Photostrom. Die elektrische Kopplung wurde vermutlich durch restliche Zellwandproteine auf der Vesikeloberfläche verhindert. Deshalb wurden die Vesikel 1 h lang bei 37°C mit Chymotrypsin inkubiert (0,1 mg/mg Vesikelprotein). Diese vorbehandelten Zellvesikel ergaben nach Zugabe zur positiv geladenen Lipidmembran in Gegenwart von 10 μM $\text{T}\Phi\text{B}^-$ stationäre Photoantworten (Abb.40a). HR enthaltende Asolectinvesikel ergaben unter exakt gleichen Bedingungen Photoantworten mit umgekehrten Vorzeichen (Abb.40b). Der Chloridtransport in den HR-Asolectinvesikeln findet also von innen nach außen statt (inside-out Vesikel). Aus Abb.40a+b ist zu ersehen, daß der Photostrom unter gleichen Bedingungen in Zellvesikeln schneller abnimmt als in den Proteoliposomen. Drei Parameter können für diesen Effekt verantwortlich sein, erstens Unterschiede im Innenvolumen, zweitens die unterschiedliche Richtung der Chloridtranslokation und drittens Unterschiede in der Permeabilität. Das Membranpotential, das durch die Pumpe hervorgerufen wird, kann Werte von mindestens 180 mV erreichen (Mukohata & Kaji, 1980), was einem $\text{T}\Phi\text{B}^-$ -Gradienten mit einem Konzentrationsverhältnis von 1000 entspricht. Deshalb reichern die Proteoliposomen bei einer $\text{T}\Phi\text{B}^-$ -Konzentration von 1 μM in der Kuvette das $\text{T}\Phi\text{B}^-$ bis 1 mM an, bevor der stationäre Strom auf 0 abgefallen ist.

a)



b)

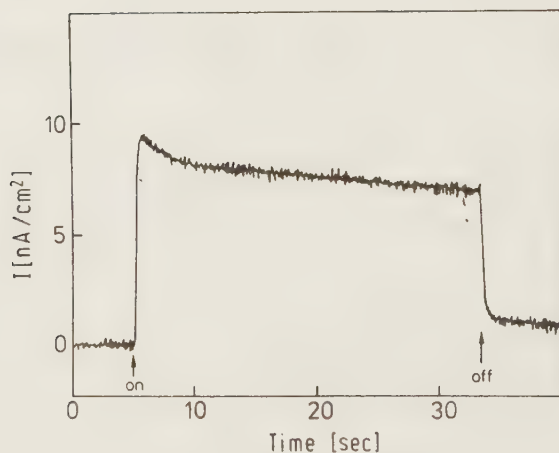


Abb.40

a) Durch Zellvesikel ($200 \mu\text{l}$) induzierter stationärer Photostrom in Gegenwart von $1 \mu\text{M}$ T Φ B $^-$, 1 M NaCl, 0.1 mM HEPES pH 6.5, positiv geladene Membran.

b) Stationärer Photostrom in Gegenwart von HR enthaltenden Asolectinvesikeln (13 nM Halorhodopsin).

In Zellvesikeln kann die innere $\text{T}\Phi\text{B}^-$ -Konzentration nur um $1\ \mu\text{M}$ bis nahezu auf 0 geändert werden, da das HR-induzierte Membranpotential umgekehrtes Vorzeichen hat. Daher sollte man erwarten, daß in Zellvesikeln nur 1/1000 der Ladungsmenge transportiert werden kann wie in den Proteoliposomen und der Strom deshalb viel schneller absinkt. Dieser Effekt wird jedoch auf Grund des viel größeren Volumens der Zellvesikel teilweise kompensiert und wird außerdem durch die Permeabilitätsunterschiede zwischen Proteoliposomen und Zellvesikeln beeinflusst.

Weiterhin ist interessant, daß nach Berechnung nur 40 $\text{T}\Phi\text{B}^-$ -Moleküle in einem Zellvesikel vorhanden sind (Durchmesser 500 Å, Volumen $6,5 \cdot 10^{-17}\ \text{l}$), die bei Belichtung unter Berücksichtigung einer Wechselzahl von 100 für HR (Weber & Bogomolni, 1981) innerhalb 1 sec herausdiffundieren. Dabei ist der Puffereffekt, der durch die Verteilung des $\text{T}\Phi\text{B}^-$ zwischen wässriger Phase und Liposomenmembran entsteht, vernachlässigt (der Verteilungskoeffizient B ist ca. $10^{-2}\ \text{cm}$, Ketterer et.al., 1971).

Außer der Bildung von stationären Strömen führt die Zugabe des lipophilen Agens $\text{T}\Phi\text{B}^-$ zu einem 5mal größeren Spitzenstrom (vgl. Abb.39 mit Abb.40). Dieser Effekt läßt sich auf die Reduktion des Ruhepotentials im Dunkeln zurückführen. Dadurch kann bei Belichtung durch die Chloridpumpe eine größere Potentialdifferenz erreicht werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß durch die chloridabhängigen stationären Photoströme an schwarzen

Lipidmembranen gezeigt wurde, daß das Chromoprotein des Halorhodopsins die lichtgetriebene Chloridpumpe in *Halobacterium Halobium* ist. Deshalb ist das Chromoprotein identisch mit Halorhodopsin (vgl. Bamberg et.al., 1984 II).

3.7 Bestimmung der Quantenausbeute für die Bildung der 410 nm-Form des Halorhodopsins

Mit Actinometerflüssigkeiten lassen sich Quantenflüsse in einer Probenlösung bestimmen ohne die Strahlung der Lichtquellen zu kennen. Die Actinometerflüssigkeit Actinochrom N (475.610, Amco) ist für den sichtbaren Bereich von 475 bis 610 nm geeignet. Die Ergebnisse werden in absoluten Einheiten von E/sec erhalten. Die Methode beruht auf Totalabsorption während der ganzen Messung. Da die Absorption der Lösungen bei der eingestrahnten Wellenlänge nicht unendlich ist, müssen die Resttransmissionen bei der Auswertung berücksichtigt werden. Um Homogenität zu erreichen, muß ausreichend gerührt werden.

Für die Bestimmung der Quantenausbeute des HR410 Produktes wurde eine Kuvette mit 1,5 ml der Actinometerlösung in den Strahlengang des Photometers gestellt und von der Seite 12 mal 15 sec lang (je 15 sec Pause) mit dem Licht einer Xenonlampe bestrahlt. Durch Verwendung eines Interferenzfilters wurde die Wellenlänge auf 552 ± 15 nm festgelegt. Nach Ausschalten des Lichtes wurde die Absorptionzunahme bei 429 nm gemessen. Sie betrug 0,077 nach 15 sec Belichtung mit 25 % Licht. Die ersten vier Belichtungen wurden zur Auswertung verwendet, da bei weiteren Messungen bereits Abweichungen von der Linearität festgestellt wurden. Zur Auswertung ist vom Hersteller ein aktinometrischer Kalibrierungsfaktor F in $M \times cm$ angegeben. Die Auswertung des Quantenflusses geschieht mit Hilfe von Gleichung:

$$I \text{ (E/Sec)} = \frac{F \cdot E_{429} \cdot V}{t \cdot d}$$

I = Quantenfluß, der in die Kuvette einfallt, in E/sec

E_{429} = Extinktionsdifferenz bei 429 nm.

t = Zeit der Bestrahlung bei 552 nm.

V = Volumen der Lösung

d = optische Weglänge

F = actinometrischer Kalibrierungsfaktor in $M \cdot cm$

$$F = (2.44 \pm 0.06) \cdot 10^{-4} M \cdot cm$$

Mit der Actinometerlösung Actinochrom N wurde für die verwendete Messanordnung ein Quantenfluß von 7,2 nE/sec ermittelt. Dieser Wert entspricht 100 % Licht und ist die Lichtmenge, die von 1,5 ml Lösung pro sec absorbiert werden kann. Wird auf 1 cm² bezogen, ergibt sich eine Quantenflußdichte von 4,8 nE·cm⁻²·sec⁻¹. Bei der Messung ist die belichtete Fläche weitgehend homogen, da 1.) Änderungen der Rührgeschwindigkeit wenig Einfluß auf das Messergebnis hatten und 2.) Abschwächung der Lichtintensität durch kalibrierte Neutralglasfilter zu einer proportionalen Abnahme der gemessenen Quantenflüsse führte.

Abb.41 zeigt für HR in 1 M NaCl, 1 % OG, 10 mM MOPS pH 7, 50 mM Azid, $t = 13^\circ C$ zeitabhängig die Entstehung der HR₄₁₀-Form bei Belichtung (100 %) Licht. Dabei ist die Absorptionsänderung bei 405 nm gegen die Zeit aufgetragen. Bei diesem Versuch wurde der Photomultiplier mit einem 405 nm Interferenzfilter versehen, um bei Belichtung detektieren zu können.

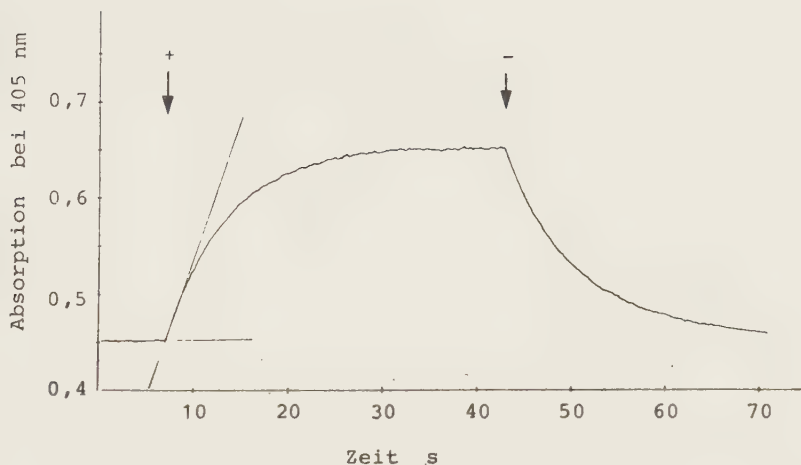


Abb.41 Kinetik der Bildung und des Zerfalls von HR_{410} in 1 M NaCl, 1 % OG, 50 mM Azid, 10 mM MOPS, pH 7,14, $T = 13^\circ\text{C}$, detektiert bei $\lambda = 405\text{ nm}$, Quantenflußdichte: $4,8\text{ nE}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$.

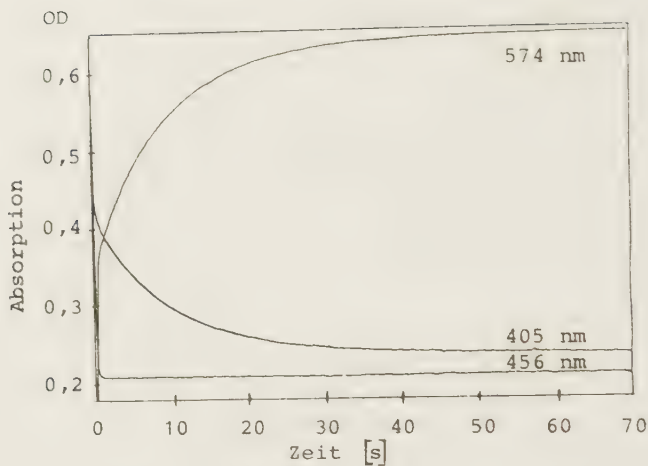
Aus der linearen Anfangssteigung wurde eine Quantenausbeute von $0,17\text{ Mol/E}$ bestimmt.

(Quantenfluß $\cdot$ Quantenausbeute = HR_{410}/sec , Quantenfluß = $7,2\cdot 10^{-9}\text{ E/sec}$, $HR_{410}/\text{sec} = 1,2\cdot 10^{-9}\text{ Mol/sec}$)

Da die Probe bei der eingestrahnten Wellenlänge eine optische Dichte von 1,7 hatte (HR_{410}), ist die Transmission noch 2,4 %. Daher liegt der korrigierte Wert der Quantenausbeute um 2,4 % höher.

Die Auftragung der Absorptionsänderungen bei 405, 574 und 456 nm nach Ausschalten des Lichtes (Abb.2A) zeigen, daß das Verschwinden der 410-Form und das Erscheinen der 580-Form synchrone Prozesse sind. Die Halbzzeit beträgt 5,5 sec unter den angegebenen Bedingungen. Die geringe Absorptionsänderung bei 456 nm bestätigt den isosbestischen Punkt bei dieser Wellenlänge. Eine logarithmische Auftragung der Absorptions-

a)



b)

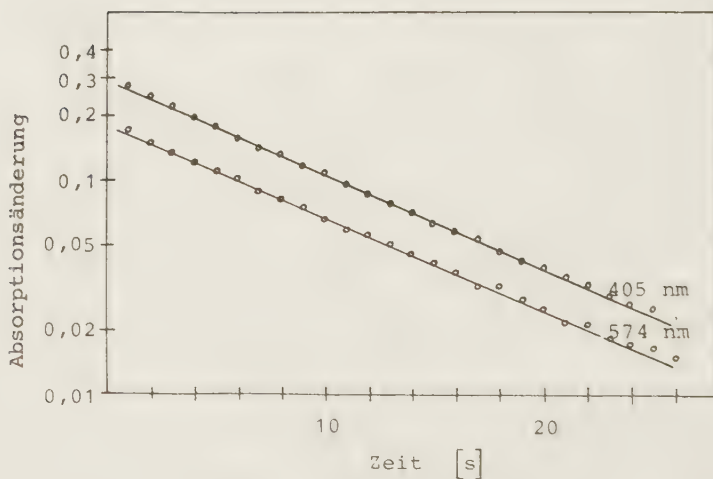


Abb.42 Kinetik der Dunkelreaktion von $HR_{4,10}$ zum Ausgangsprodukt $HR_{3,0}$ nach Belichtung. Alle Bedingungen wie in Abb.41.
 a) Zeitlicher Verlauf der Absorptionsänderungen bei 574, 405 und 456 nm.
 b) Halblogarithmische Auftragung der Daten aus 42a.

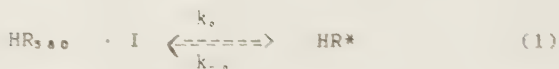
änderungen gegen die Zeit in Abb.42B zeigt parallele Kurven für beide Prozesse. Aus dem Verhältnis der Absorptionsänderungen läßt sich der Extinktionskoeffizient für die 410 nm-Form mit $31000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ bestimmen, wenn von einem Extinktionskoeffizienten von $50000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ für HR_{380} ausgegangen wird (Steiner & Oesterheld, 1983).

Es ist bereits bekannt, daß die Geschwindigkeit der HR_{410} -Bildung bei Zugabe starker anorganischer Basen beschleunigt wird (Steiner, 1983) und bei 50 mM Azid mit halbmaximaler Geschwindigkeit abläuft. Da die Bildungsgeschwindigkeit eines Photoproduktes proportional mit seiner Quantenausbeute verläuft, ist demnach die maximale Quantenausbeute für die HR_{410} -Bildung 0,34 Mol/E bei sättigenden Azidkonzentrationen.

Unter der Voraussetzung, daß die Reaktionsverzweigung, die entweder nach HR_{410} oder "direkt" zurück nach HR_{380} führt, hinter dem Photoprodukt HR_K erfolgt, ist die Quantenausbeute für HR_K immer konstant. Sie ist gleich der maximalen Quantenausbeute für die HR_{410} -Bildung bei Azidsättigung, wo HR_K quantitativ nach HR_{410} übergeht. Mit Hilfe von Blitzlichtexperimenten mit einer Zeitauflösung im msec-Zeitbereich läßt sich das Verhältnis der beiden Reaktionswege leicht bestimmen und bei allen Azidkonzentrationen die Quantenausbeuten für die verschiedenen Wege bestimmen (vgl. Kap.3.9.).

3.8 Bestimmung von Geschwindigkeits- und Gleichgewichtskonstanten für die $HR_{4,10}$ -Bildung

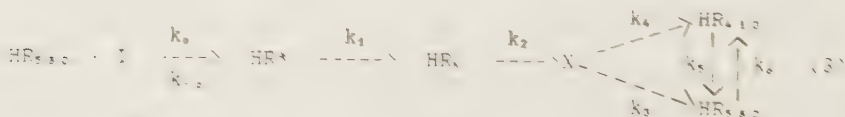
Für Photoreaktionen gilt allgemein, daß der primäre Schritt die Lichtanregung vom Grundzustand S_0 zum ersten angeregten S_1 -Zustand ist. Dieser Anregungsprozess läßt sich im Bereich linearer Lichtabhängigkeit wie eine bimolekulare Reaktion zweiter Ordnung beschreiben. Im Fall von HR gilt:



[580] ist die Konzentration des HR im Grundzustand S_0 und $[HR^*]$ die Konzentration im angeregten Zustand S_1 . Die Bildungsgeschwindigkeit des angeregten Zustandes HR^* läßt sich beschreiben durch:

$$\frac{d[HR^*]}{dt} = [HR_{4,10}] \cdot I \cdot k_1 - [HR^*] \cdot k_{-1} \quad (2)$$

Der angeregte Zustand HR^* reagiert zum Photoprodukt HR_k und im Dunkeln weiter zu verschiedenen Folgeprodukten:



Das primäre Photoprodukt HR_k ist bereits genauer untersucht worden (Pollard et.al., 1984). Ob zwischen HR_k und $HR_{4,10}$ weitere Zwischenprodukte existieren, konnte bisher nicht beantwortet werden. Diese Möglichkeit soll jedoch mit der

Einführung der Unbekannten X berücksichtigt werden. An welcher Stelle der Reaktionsfolge das Photocyclusintermediat $HR_{2,0}$ einzuordnen ist, soll im folgenden noch diskutiert werden. Entweder geht von ihm die Verzweigung aus, damit wäre es mit X identisch oder es ist zwischen X und $HR_{3,0}$ anzuordnen.

Zu welchem Folgeprodukt, $HR_{4,0}$ oder $HR_{5,0}$, der Reaktionsverlauf führt, läßt sich durch verschiedene Parameter wie z.B. Zugabe von starken anorganischen Basen beeinflussen.

Um die Bildungsgeschwindigkeit des $HR_{4,0}$ beschreiben zu können, müssen verschiedene Fälle unterschieden werden. Ziel der folgenden Ableitung ist es, einen allgemeinen Ausdruck für die Anfangsgeschwindigkeit der $HR_{4,0}$ -Bildung zu definieren, wobei angenommen wird, daß k_1 und k_2 groß gegenüber k_4 sind, und damit die Bildung der vorgelagerten Photoprodukte HR_* und X sehr schnell gegenüber der Bildung von $HR_{4,0}$ ist. Der Übergang von HR_* nach HR_* wurde bereits untersucht und eine Bildungsgeschwindigkeit von $\tau=5ps$ gefunden (Polland et.al.,1984). Damit läßt sich die Anfangsgeschwindigkeit der $HR_{4,0}$ -Bildung definieren als:

$$V_{0,4,0} = k_4 \cdot [HR_*] \quad (4)$$

Da jedoch weder k_4 noch $[HR_*]$ direkt bestimmt werden können, muß ein anderer Ausdruck für V_0 mit anderen Variablen gefunden werden, die ohne weiteres gemessen werden können. Dazu soll mit einer Geschwindigkeitsgleichung 2. Ordnung für die Bildung von HR_* aus [580] und I begonnen werden.

$$\frac{d[\text{HR}^*]}{dt} = k_0 \cdot ([\text{HR}] - [\text{HR}^*]) \cdot I \quad (5)$$

Hierbei ist k_0 die Geschwindigkeitskonstante für die Lichtanregung und $[\text{HR}]$ die Gesamtkonzentration an HR. k_0 ist gleich ϵ und damit gleich dem Extinktionskoeffizient für den Grundzustand.

Folgende Geschwindigkeitsgleichung gilt für den Zerfall von HR^* als Summe zweier Reaktionen. Während bei der ersten das Produkt HR_{10} entsteht (Hinreaktion), beschreibt die zweite die Rückbildung des Ausgangsproduktes bei gleichzeitiger Wärmelöschung und Abstrahlung von Licht (Fluoreszenz). Man erhält:

$$\frac{-d[\text{HR}^*]}{dt} = k_{-0} \cdot [\text{HR}^*] + k_1 \cdot [\text{HR}^*] \quad (6)$$

Bei konstanter Belichtung gilt beim Erreichen des Gleichgewichtes:

$$k_0 \cdot ([\text{HR}] - [\text{HR}^*]) \cdot I = k_{-0} \cdot [\text{HR}^*] + k_1 \cdot [\text{HR}^*] \quad (7)$$

Die Gleichung läßt sich umformulieren zu :

$$\frac{([\text{HR}] - [\text{HR}^*]) \cdot I}{[\text{HR}^*]} = \frac{k_{-0} + k_1}{k_0} \quad (8)$$

Die zusammengesetzte Konstante $k_m = (k_{-0} + k_1)/k_0$ läßt sich mit einer Michaelis-Menten Konstanten vergleichen. Durch Umformen läßt sich die Gleichgewichtskonzentration $[\text{HR}^*]$ ausdrücken:

$$[HP^*] = \frac{[HR] \cdot I}{k_M + I} \quad (9)$$

Mit der Anfangsgeschwindigkeit $V_{0,10} = k_4 \cdot [HP^*]$ läßt sich $[HP^*]$ in Gleichung (8) einsetzen.

$$V_{0,10} = k_4 \cdot \frac{[HR] \cdot I}{k_M + I} \quad (10)$$

Ist die Lichtintensität so hoch, daß HR im wesentlichen im angeregten Zustand als HR^* vorliegt, wird die maximale Anfangsgeschwindigkeit $V_{10\infty}$ erreicht. Für sie gilt:

$$V_{10\infty} = k_4 \cdot [HR] \quad (11)$$

Unter diesen Bedingungen läßt sich direkt k_4 und damit die Entstehungszeit von HR_{10} bestimmen. Man kann den Ausdruck $k_4 \cdot [HR]$ in Gleichung (9) durch $V_{10\infty}$ ersetzen.

$$V_{0,10} = \frac{V_{10\infty} \cdot I}{k_M + I} \quad (12)$$

Diese Formel gibt einen Zusammenhang zwischen Anfangsgeschwindigkeit, Maximalgeschwindigkeit und Lichtintensität wieder.

Bei niedrigen Lichtintensitäten ist die Anfangsgeschwindigkeit $V_{0,10}$ zur Lichtintensität und HR-Konzentration proportional. Die Reaktion verläuft 2. Ordnung. Lichtintensität und eine lineare Abhängigkeit bis 100 %.

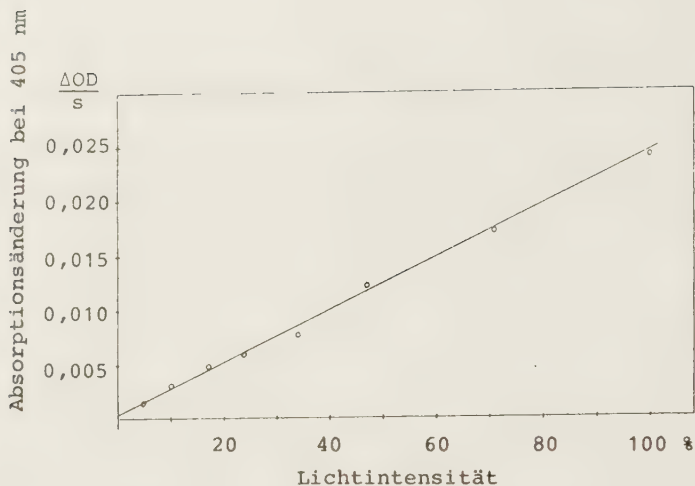


Abb. 43

Anfangsgeschwindigkeit der HR_{410} -Bildung als Funktion der Lichtintensität bei pH 7,87, 1 M NaCl, 1 % OG, 50 mM Azid. 100 % Licht entspricht einer Quantenflußdichte von $4.8 \text{ nE} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$. Die Wellenlänge des eingestrahlten Lichtes war $552 \pm 15 \text{ nm}$, HR-Konzentration 36 nMol/ml , $\lambda_{405} = 405 \text{ nm}$.

In dem verwendeten Versuchsaufbau konnten also sättigende Lichtintensitäten nicht erreicht werden.

Aus verschiedenen Gründen läßt sich k_4 aber auch bei sättigenden Lichtintensitäten mit großer Wahrscheinlichkeit unter den Versuchsbedingungen in Abb. 41 nicht direkt bestimmen. 1.) Bei sättigenden Lichtintensitäten geht bei Anschalten des Lichtes alles HR schneller als in 1 psec in HR^* über und die Anfangsgeschwindigkeit V_{410} ist gleich $1/k_4$. Die HR_{410} -Bildungsreaktion wird aber möglicherweise im ähnlichen Zeitbereich (ms) wie die 410-Bildung im BR liegen und wäre damit im Photometer nicht auflösbar. 2.) Um k_4 aus der Gleichgewichtseinstellung bei Dauerlicht zu bestimmen, mußten k_4 und k_5 (für die Rückreaktion) in der gleichen Größenordnung liegen, damit das Verhältnis 410/580 nicht

sehr groß wird. Diese Bedingung ist jedoch nur bei pH ca. 1 möglich, wobei HR jedoch denaturiert. 3.) Bei Dauerbestrahlung (sec bis min) mit sättigenden Lichtintensitäten wird der Chromophor zum großen Teil irreversibel zerstört.

Aus diesen drei Gründen ist der einfachste Weg zur Bestimmung von k_4 die Blitzlichtphotolyse mit einer Zeitauflösung im μsec -Bereich die weiter unten noch diskutiert wird.

Ohne Erreichen von Lichtsättigung lassen sich die Geschwindigkeitskonstanten k_0 , k_{-0} und k_1 nicht separieren. Für die weitere Untersuchung wird die Reaktionsgleichung der Reaktion von $\text{HR}_{5,0}$ nach $\text{HR}_{4,0}$ für den Bereich linearer Lichtabhängigkeit vereinfacht. Da bei der Reaktion Protonen frei werden, wird die Protonenkonzentration berücksichtigt. Es ergibt sich folgendes vereinfachtes Reaktionsschema:



Die hierbei auftretende Konstante k_4' enthält k_0 , k_{-0} , k_1 , k_2 und k_4 und ist eine Funktion der Temperatur und der Azidkonzentration in der Lösung. Die Rückreaktion 410 nach 580 erfolgt thermisch und ist pH-abhängig. Das Gleichgewicht für die Dunkelreaktionen kann beschrieben werden durch:



Für die Geschwindigkeit der 410-Bildung gilt:

$$\frac{d410}{dt} = [580] \cdot I \cdot k_4' - [410] \cdot [H^+]^n \cdot k_5 \quad (16)$$

Die thermische Reaktion von 580 nach 410 wurde bei der Formulierung der Geschwindigkeitsgleichung vernachlässigt, da sich im Dunkeln bei neutralem pH und 50 mM Azid kein HR_{410} bildet. Damit ist die Anfangsgeschwindigkeit $V_{0,410}$:

$$V_{0,410} = [580] \cdot I \cdot k_4' \quad (17)$$

Aus der Auftragung von $V_{0,410}$ gegen die Lichtintensität (Abb.43) läßt sich bei bekanntem Photonenfluß die apparente Geschwindigkeitskonstante k_4' für den Bereich linearer Lichtabhängigkeit berechnen. Da während der Messung der Lichtabhängigkeit derselbe Aufbau und dieselbe Probe wie bei der Messung der Quantenausbeute verwendet wurden, kann von dem berechneten Quantenfluß ausgegangen werden.

$$k_4' = 5.4 \cdot 10^6 \text{ cm}^2/\text{E}$$

(nach Gl.17: $V_{0,410} = 9.4 \cdot 10^{-7} \text{ Mol/l}$; $[580] = 3.6 \cdot 10^{-5} \text{ Mol/l}$;
 $I = 4.8 \cdot 10^{-9} \text{ E} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$)

Bei konstanter Belichtung läßt sich für den Gleichgewichtszustand formulieren:

$$\frac{[410]}{[580]} = \frac{I \cdot k_4'}{[H^+]^n \cdot k_5} \quad (18)$$

Um die Abhängigkeit von der Protonenkonzentration zu

bestimmen, wurde bei verschiedenen pH-Werten belichtet und das Verhältnis $[410]/[580]$ gegen $1/[H^+]$ aufgetragen (Abb.43).

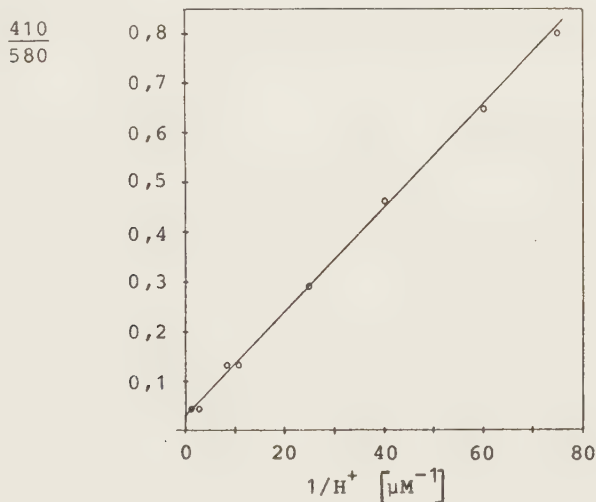


Abb.44

Verhältnis von HR_{410}/HR_{580} als Funktion der Protonenkonzentration. Alle anderen Bedingungen wie in Abb.43.

Aus Abb.44 folgt, daß die Protonenkonzentration linear in Gleichung (15) eingeht. Die Rückreaktion HR_{410} nach HR_{580} ist also bimolekular und zweiter Ordnung. Die Tatsache, daß in Abb.42B die Auftragung von $\log HR_{410}$ gegen die Zeit eine Gerade ergibt, ist darauf zurückzuführen, daß bei dem Versuch in Abb.42B in 10 mM-Puffer gearbeitet wurde. Damit ist die Protonenkonzentration konstant. Die Reaktion verläuft pseudo 1. Ordnung.

$$\frac{[410]}{[580]} = \frac{I}{[H^+]} \cdot K' \quad (19)$$

K' ist die app. Gleichgewichtskonstante und der Quotient aus den Geschwindigkeitskonstanten k_4' und k_5 . Für K' ergibt sich damit aus Abb.44:

$$K' = 2.3 \text{ (Mol} \cdot \text{sec} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{E}^{-1} \text{)}$$

(nach Gl.19: $410/580 = 0.8$; $1/H^+ = 7.3 \cdot 10^7 \text{ l/Mol}$; $I = 4.8 \cdot 10^{-9} \text{ E} \cdot \text{sec}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$)

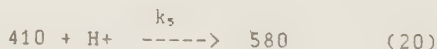
Diese app. Gleichgewichtskonstante gilt ebenfalls für den Bereich linearer Lichtabhängigkeit, 50 mM Azid und $T=13^\circ\text{C}$.

Da die Gleichgewichtskonstante der Quotient der Geschwindigkeitskonstanten für die Bildung und den Zerfall von HR_{410} ist, läßt sich die Geschwindigkeitskonstante für die thermische Rückreaktion (410-Zerfall) k_5 aus den beiden app. Konstanten K' und k_4' ausrechnen.

$$k_5 = 2.4 \cdot 10^6 \text{ (l} \cdot \text{Mol}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1} \text{)}$$

($k_5 = k_4' \cdot K'$; $k_4' = 5.4 \cdot 10^6 \text{ cm}^2/\text{E}$; $K'=2.3 \text{ Mol} \cdot \text{sec} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{E}^{-1}$)

Diese thermische Konstante ist unabhängig von der Lichtintensität und gilt auch im Bereich der nicht linearen Lichtabhängigkeit für die Reaktion:



Aus k_5 resultiert bei 1 M H^+ (pH 0) ein Zerfall von $3 \cdot 10^6$ Molekülen pro Sekunde und eine Zerfallszeit $\tau = 1/k = 330 \text{ nsec}$. Bei pH 7 ergibt sich eine Zerfallszeit von 3 sec, die mit den beobachteten Werten gut übereinstimmt.

Aus der Auswertung der Anfangsgeschwindigkeit der 580-Rückbildung nach Ausschalten des Lichtes läßt sich k_5 auch direkt bestimmen.

Die Auswertung bei pH 7.87 ergab k_5 :

$$k_5 = 3.8 \cdot 10^6 \text{ l} \cdot \text{Mol}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$$

$$(V_{0,th} = 410 \cdot H^+ \cdot k_5; V_{0,th} = 7 \cdot 10^7 \text{ Mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}; 410 = 1.33 \cdot 10^{-5} \text{ Mol/l}; H^+ = 1.5 \cdot 10^{-8} \text{ Mol/l})$$

Um eine genauere Analyse der Bildung und des Zerfalls von HR_{410} durchzuführen, muß die Reaktion von X nach HR_{580} in die kinetische Betrachtung einbezogen werden. Aus der Parallelität der Absorptionsänderungen bei 574 und 405 nm in Abb.42b geht jedoch hervor, daß bei Dauerbelichtung alles ausgebleichte HR in HR_{410} übergeht. Außerdem wird die Reaktion von X nach HR_{580} durch Azid nicht beeinflusst (siehe folgendes Kap.). Aus diesem Grunde ist diese Reaktion bei der Betrachtung der HR_{410} -Kinetik unter stationären Bedingungen in Gegenwart von 50 mM Azid zu vernachlässigen.

3.9 Blitzlichtphotolyse

Um die Geschwindigkeit der $HR_{4,0}$ -Bildung und damit die Geschwindigkeitskonstante k_4 lichtunabhängig bestimmen zu können, wurden einige Blitzlichtphotolyseexperimente durchgeführt. Als Probe wurde nativ isoliertes HR in 1 M NaCl, 1 % OG, 10 mM MOPS pH 7,15 verwendet. Die Anregung erfolgte bei 570 nm mit einem ns-Laser (Farbstofflaser: Lambda Physics EMG 102 in Kombination mit Lambda Physics Dye FL 2000). Um den zeitlichen Verlauf der Rückkehr des $HR_{3,0}$ -Grundzustandes zu verfolgen, wurde die Absorptionsänderung bei 610 nm aufgenommen, da bei dieser Wellenlänge das $HR_{2,0}$ -Photozyklusintermediat nicht mehr absorbiert.

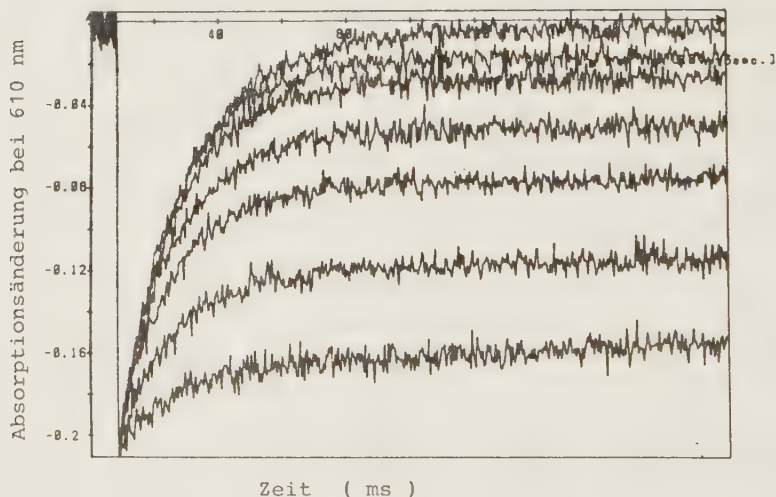


Abb.45 Laser induzierte Absorptionsänderung ($\lambda_{\text{ex}} = 570 \text{ nm}$) des HR in 1 M NaCl, 1 % OG, 10 mM MOPS pH 7,15 bei 610 nm in Gegenwart von 0,6,12,25,50,100,200 mM Natriumazid in der Zeit von 0-200 ms nach dem Blitz.

Abb.45 zeigt den zeitlichen Verlauf der Absorptionsänderungen bei 610 nm in Gegenwart verschiedener Azidkonzentrationen im Bereich von 0-100 ms nach Anregung. Nach Zugabe von Azid bleibt die Ausbleichamplitude (nach 0,1 ms) konstant (bei schwachem Messlicht). Die Rückkehr zum Ausgangsprodukt verläuft jedoch biphasig, wobei der Anteil der langsamen Komponente mit steigenden Azidkonzentrationen zunimmt und dem Übergang $HR_{4,0}$ nach $HR_{8,0}$ entspricht (vgl. vorheriges Kap.). Die schnelle Zerfallszeit bleibt bei Zugabe von Azid unverändert ($\tau_1 = 22 \text{ ms}$). Die Zerfallszeit von $HR_{4,0}$ wird ebenso wie die Bildung von $HR_{4,0}$ durch Azid beschleunigt (τ bei pH 7,04 in 1 M NaCl, 1 % OG: 50 sec, bei 50 mM Azid: 1,6 sec). Azid katalysiert also Hin- und Rückreaktion. Unter der Voraussetzung, daß in dem beobachteten Zeitbereich außer dem Grundzustand kein Produkt auftritt, daß bei 610 nm absorbiert, sind die Quantenausbeuten des Photozyklus mit und ohne Azid gleich. Der Photozyklus weist lediglich eine Reaktionsverzweigung auf.

Um die Geschwindigkeit der $HR_{4,0}$ -Bildung zu bestimmen, wurde bei hoher Azidkonzentration (200 mM) die lichtinduzierte Absorptionzunahme bei 410 nm verfolgt (Abb.46) und eine Anstiegszeit von $\tau = 15 \text{ ms}$ ermittelt. Es ergibt sich für diese Azidkonzentration (200 mM) die durch stationäre Messungen nicht ermittelbare lichtunabhängige Geschwindigkeitskonstante $k_4 = 6,7 \cdot 10^2 \text{ [1/s]}$. Da eine Konzentration von 200 mM 80 % Sättigung entspricht gilt für Azidsättigung $K_4 = 8,4 \cdot 10^2 \text{ [1/s]}$.

Die Zerfallszeit wurde bei dieser Wellenlänge ebenfalls mit $\tau = 1,7 \text{ s}$ bestimmt und entspricht ungefähr dem bei 610 nm

ermittelten Wert (1.6 s).

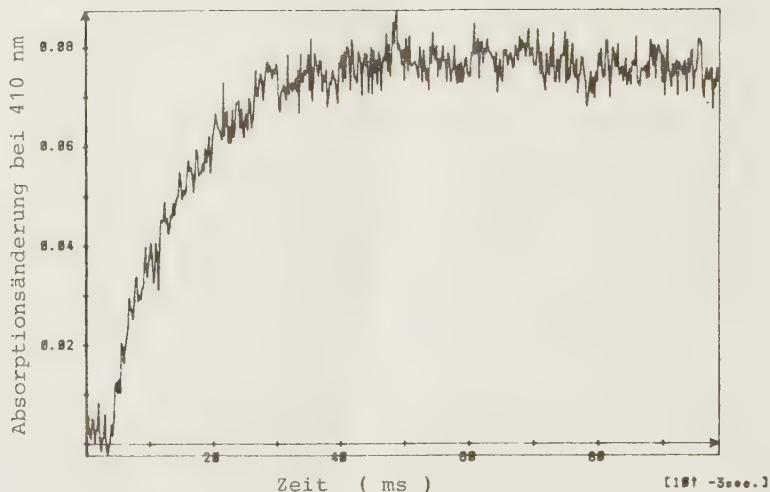


Abb.46 Laser induzierte Absorptionzunahme des HR in 1 % OG, 1 M NaCl bei 410 nm in Gegenwart von 200 mM Azid in der Zeit von 0-100 ms nach Blitz. Das Messlicht hatte eine Wellenlänge von 410 ± 10 nm, alle anderen Bedingungen wie in Abb.45.

Um das HR_{520} Produkt in die Reaktionsfolge einordnen zu können, wurde bei 490 nm die Absorptionsänderung verfolgt. Abb.47a zeigt nach einer Absorptionzunahme ebenfalls eine biphasige Absorptionsabnahme, die bei dieser Wellenlänge bis unter die Absorption der Dunkelprobe erfolgte. Die negativen Absorptionswerte kommen dadurch zustande, daß die Bildung des HR_{410} eine Absorptionsabnahme bei 490 nm zur Folge hat. Wird die Absorptionsänderung, die mit der HR_{410} Zerfallszeit von 1.7 s erfolgt, von Abb.47a subtrahiert, so erhält man die isolierte Absorptionsänderung für den Zerfall von HR_{520} (Abb.47b.). Für die Zerfallszeit ergibt sich $\tau = 13$ ms, also eine kürzere Zeit als die, mit der die Rückbildung des HR_{500}

erfolgt. Entweder liegt noch ein Intermediat zwischen HR_{520} und HR_{580} , oder HR_{520} zerfällt in verschiedene Komponenten. Da die Bildung von HR_{410} ebenfalls langsamer als der Zerfall von HR_{520} ist, kann geschlossen werden, daß HR_{520} sowohl zu HR_{410} als auch zu HR_{580} weiterreagieren kann. Durch Zugabe von Azid wird der Wert für k_4 größer und dadurch ebenso das Verhältnis von HR_{410}/HR_{580} . Die von HR_{520} ausgehende Verzweigung wird dadurch bestätigt, daß in Abwesenheit von Azid bei einer Chloridkonzentration von 4 M, wenn während des Photocyklus weniger als 2 % HR_{410} gebildet wird (bei pH 7), der Zerfall von HR_{520} und die Rückbildung von HR_{580} gleich schnell verlaufen ($\tau=15$ ms).

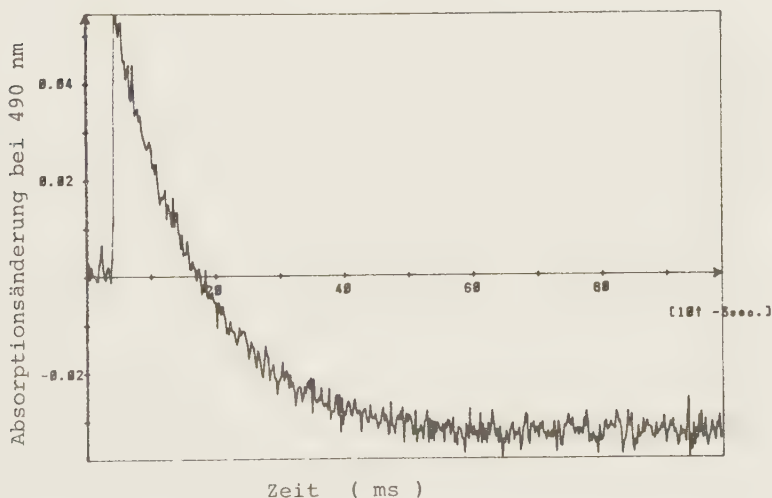
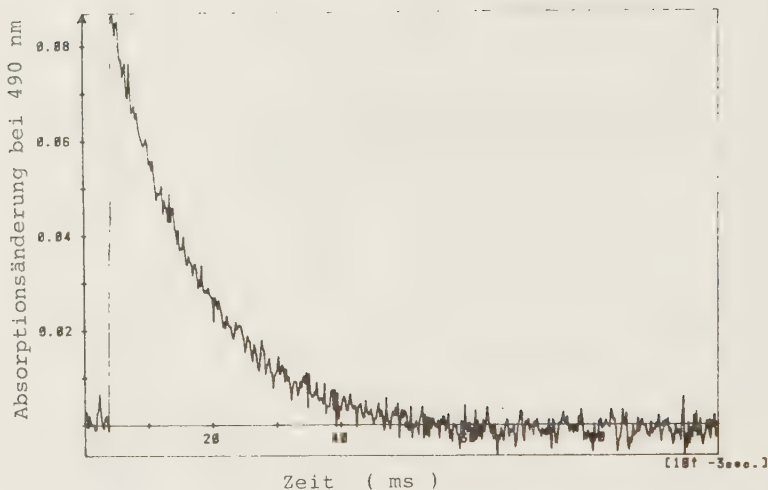


Abb.47 a) Laser induzierte Absorptionsänderung des HR bei 490 nm in Gegenwart von 200 mM Azid 0-100 ms nach Blitz.



b) Laser induzierte Absorptionsänderung des HR bei 490 nm in Gegenwart von 200 mM Azid nach Subtraktion des langsamen Anteils mit $\tau=1,7$ s 0-100 ms nach Blitz.
(alle anderen Bedingungen in a und b wie in Abb.45)

Die Rückbildung von HR_{520} nach HR_{500} wurde bei 1 M und bei 4 M NaCl beobachtet. Dabei wurde festgestellt, daß auch in Abwesenheit von Azid nur in Gegenwart von 4M NaCl der Zerfall von HR_{520} und die Rückbildung des Ausgangsproduktes HR_{500} mit der genau gleichen Geschwindigkeit verlaufen. Diese Beobachtung ließ vermuten, daß zwischen HR_{520} und HR_{500} noch ein weiteres Intermediat liegt. Um diese Frage zu klären, wurden die Chromophorverschiebungen während des Photozyklus in Gegenwart von 1 M NaCl durch Aufnahme transientser Absorptionsspektren im Abstand von 200 μ sec nach Blitz beobachtet. Daraus hat sich ergeben, daß bei 660 nm das Differenzabsorptionsmaximum des erwarteten "späten" Photozyklusintermediates liegt. Abb.48 zeigt den zeitlichen

Verlauf der im ms-Bereich auftretenden Absorptionsänderungen bei 590, 520 und 660 nm.

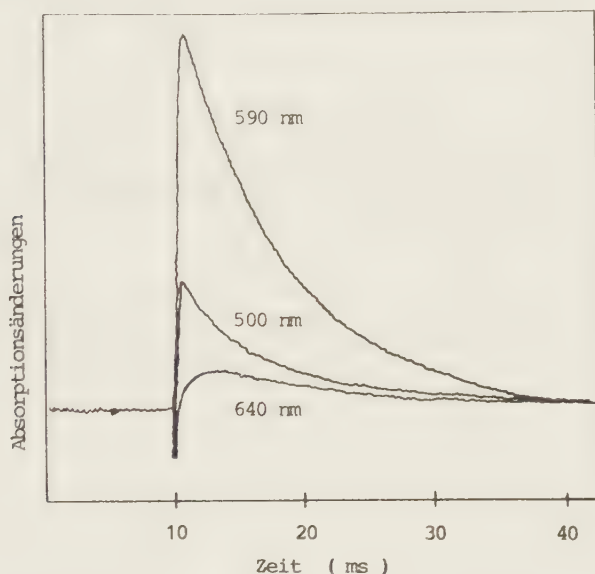
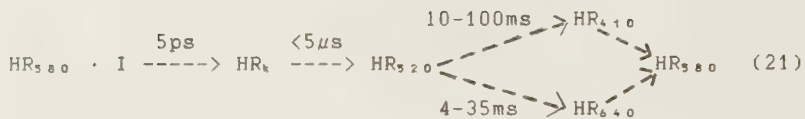


Abb.48 Vergleich der Absorptionsänderungen des HR in 1M NaCl, 1 % OG bei 580, 500 und 660 nm 0-40 ms nach Blitz, pH=7.05.

Durch Subtraktion vom Grundspektrum wurde das Absorptionsmaximum dieses "späten" Zyklusintermediates bei 640 nm gefunden ($HR_{4,0}$). Die Bildungsgeschwindigkeit von $HR_{4,0}$ nimmt mit zunehmender Chloridkonzentration ab. Damit nimmt die intermediär auftretende Konzentration an $HR_{4,0}$ ebenfalls ab und die Rückbildung von $HR_{5,0}$ erfolgt langsamer. Eine Verlangsamung des Photozyklus bei zunehmenden Chloridkonzentrationen wurde bereits von Weber und Bogomolni (1982) beobachtet.

Mit Hilfe der Ergebnisse der Blitzlichtphotolyse läßt sich die unbekannte Größe X in Gleichung (3) als $HR_{5,20}$

identifizieren und der Photozyklus in Hochsalz (1 M NaCl) vervollständigen zu:



Die Bildung von $\text{HR}_{5,2,0}$ wurde mit $<5\mu\text{s}$ nur ungefähr ermittelt.

4. DISKUSSION

Das Konzept des Chloridtransportes über die Zellmembran hat sich bereits zu einem etablierten Forschungsgebiet entwickelt, das die Interpretation des Anionenaustausches in roten Zellmembranen, den Mechanismus der Reabsorption in den Nierentubuli, das Verständnis der Magensekretion, die Kontrolle der Flüssigkeitsbewegungen und die Durchlässigkeit der Kornea im Auge sowie den Mechanismus der Osmoregulation in Fischen und Amphibien betrifft (gute Übersicht in Zadunaisky, 1982). Alle diese Systeme wurden in erster Linie elektrophysiologisch unter Verwendung verschiedener Inhibitoren untersucht. Das Chlorid wird in den meisten Fällen nicht elektrogen sondern im Austausch gegen OH^- oder HCO_3^- oder als Symport zusammen mit Protonen oder anderen Kationen transportiert. Neben dem HR ist die einzige elektrogene Chloridpumpe die ATP getriebene in *Acetabularia* (Gradmann, 1975).

Zum Verständnis von aktiven vektoriellen Transportsystemen sind immer zwei grundsätzliche Aspekte zu berücksichtigen. Der erste ist das molekulare Verständnis des "Schalters", mit dessen Hilfe der Transport nur in eine Richtung abläuft. Für diesen irreversibelen Prozess im Halorhodopsin wird weiter unten ein erstes Modell vorgeschlagen. Der zweite Aspekt ist die Identifizierung einzelner Aminosäuren, über die das transportierte Ion über die Membran geleitet wird. Die Art dieser Aminosäuren sind wohl in verschiedenen Systemen, die das gleiche Ion transportieren, von ähnlicher Natur.

Aufgrund der stark basischen Natur und der hohen Ionisationsenthalpien wurden in mehreren Chloridtransportierenden Systemen Argininreste als Chloridbindungsstellen identifiziert (With & Brahm, 1980, Lassen et.al., 1980). Falke et.al. (1984) haben mit Hilfe der ^{35}Cl -NMR Spektroskopie Chloridbindungsstellen im Halorhodopsin in Abhängigkeit vom pH untersucht und gezeigt, daß beide gefundenen Bindungsstellen bis pH 12 unverändert bleiben. Anscheinend spielen also auch im HR Arginine eine wichtige Rolle beim Chloridtransport. Diese Vermutung wird durch einen besonders hohen Argininanteil in den Aminosäureanalysen von HR unterstützt. Die vier im BrCN-Peptid 7 gefundenen Arginine scheinen hierfür besonders geeignet zu sein. Für einen aktiven Transport von Chlorid über eine Membran von 60-80 Å sind mit Sicherheit eine Reihe von positiv geladenen Aminosäuren im hydrophoben Teil der Membran erforderlich. Die Ladung im Arginin ist wesentlich besser delokalisiert als im Lysin und braucht deshalb in der Membran nicht direkt durch eine negativ geladene Carboxylgruppe neutralisiert zu werden. Aus diesem Grund sind Arginine für den Chloridtransport über die Membran von allen Aminosäuren am besten geeignet.

Zur Aufklärung des Schalters, der den irreversiblen Transportschritt vermittelt, sind beim BR zahlreiche Untersuchungen durchgeführt worden, die bisher jedoch keine endgültige Klärung erbrachten. Das Bacteriorhodopsin katalysiert eine vektorielle Ladungstrennung, die durch eine photochemische Aktivierung des Retinalchromophors getrieben wird.

Theoretische Berechnungen und Modellexperimente für Rhodopsin und Bacteriorhodopsin (Honig et.al.,1979 II, Sheves et.al.,1979, Motto et.al.,1980, Nakanishi et.al., 1980) führten zu einem Punktladungsmodell mit zwei negativen Ladungen nahe des Retinylidenchromophors. Diese Ladungen stehen in Wechselwirkung mit der protonierten Schiffschen Base (Honig et.al.,1979 I). Lichtanregung führt zu einer intrachromophoren Ladungstrennung, wobei die transiente Ladungsrekombination durch trans-cis-Isomerisierung der C13-Bindung verhindert wird (Schulten & Tavan,1978, Honig et.al.,1979 II, Warshel, 1979). Als Folge dieses Primärereignisses wurde eine Ladungsdiffusion entlang zwei "hydrogen-bonded-Passways" postuliert (Nagel & Morowitz, 1978), zwischen denen das Retinal als aktiver Schalter fungiert. Dieser führt das Proton in einen Diffusionsweg, der mit dem äußeren Medium in Verbindung steht, und nimmt von einem zweiten Diffusionsweg, der mit dem cytoplasmatischen Raum in Verbindung steht, ein Proton wieder auf. Ob die Protonenleitung durch Weitergabe eines Protons (Kanal) oder durch Verschiebung und Drehung von O-H Bindungen (Leitung wie im Eis), mit oder ohne Beteiligung von Wasser erfolgt, ist bisher nicht geklärt.

Beim HR wurden erst einige wenige Untersuchungen durchgeführt, die aber bereits interessante Ergebnisse erbracht haben und einen ersten Vergleich mit dem BR ermöglichen.

Der HR-Chromophor enthält wie BR all-trans- und 13-cis-Retinal. Das Absorptionsmaximum liegt bei niedrigen

Chloridkonzentrationen bei 565 nm. bei hohen Chloridkonzentrationen bei 578 nm. Von beiden HR-Formen gehen verschiedene Photocyclen aus, von denen der Hochsalzzyklus mit dem Chloridtransport verbunden ist. Durch Zugabe von starken anorganischen Basen wie Azid oder Thiocyanat erfolgt eine Verzweigung des Photocyklus zu einem bei 410 nm absorbierenden Produkt, wobei Protonen ins Medium abgegeben werden. Dieses HR_{410} -Produkt kehrt im Sekundenbereich zum Ausgangszustand HR_{580} zurück und ist kein Intermediat einer der beiden HR-Photocyclen sondern eine Nebenreaktion. Es ist mit dem 412 nm Intermediat des BR-Photocyclen vergleichbar. Absorptionen bei 410 nm sind nur dadurch zu erklären, daß die Schiff'sche Base deprotoniert vorliegt (für BR vgl.: Braiman & Mathies, 1980, Tsuda et.al., 1980). In Abwesenheit von Chlorid bildet sich die HR_{410} -Form besonders leicht. Wahrscheinlich ist eine Chloridbindungsstelle in unmittelbarer Nähe der Schiff'schen Base nicht mehr besetzt und das Proton kann leichter an eine Seite der Membran abgegeben werden. Wird in Gegenwart von Chlorid diese Chloridbindungsstelle kompetitiv von Azid besetzt, kann dieses als starke Base das Schiffbasenproton übernehmen und die Bildung der HR_{410} -Form auch in Gegenwart von Chlorid ermöglichen. Bei der Reaktion zum 410 nm Produkt wird ein Proton abgespalten, das bei der Rückreaktion zum Ausgangszustand HR_{580} wieder aufgenommen werden. Deshalb begünstigen hohe pH-Werte ebenfalls die Bildung von HR_{410} . Der pH-Wert der Lösung ist also ein weiterer Parameter, der Reaktionsgeschwindigkeiten im HR-Photozyklus beeinflussen kann. Da die Bildungs- und Zerfallsgeschwindigkeiten einzelner Intermediate der

HR-Photozyklen also durch mindestens 3 verschiedene Parameter wie Chloridkonzentration, pH-Wert und durch die Anwesenheit verschiedener anorganischer Basen unterschiedlich stark beeinflusst werden. treten die Intermediate unter verschiedenen Bedingungen in unterschiedlichen Konzentrationen auf. Auf Grund dieser Tatsache waren die Vorstellungen über den Photozyklus bisher sehr widersprüchlich.

Da Bildung und Zerfall der $HR_{4,0}$ -Form mit einer Protonenabgabe und -wiederaufnahme verbunden ist, könnte ein Photozyklus, der über $HR_{4,0}$ -Form abläuft, mit einer Protonentransportaktivität verbunden sein. Dazu müsste im HR wie im BR ein Primärakzeptor für Protonen vorhanden sein, eine Protonenleitung durch die gesamte Membran möglich sein und die Rückreaktion $HR_{4,0}$ nach $HR_{5,0}$, im ms-Zeitbereich erfolgen. Diese Bedingungen scheinen nicht erfüllt zu sein. Ein mit der $HR_{4,0}$ -Bildung verbundener Protonentransport wird nicht beobachtet.

Das langwellige Absorptionsmaximum des HR-Chromophorspricht dafür, daß ähnliche Ladungsverhältnisse wie beim BR vorliegen. Beim Einbau des Retinals ins Protein sind beim HR ebenfalls wesentliche Änderungen gegenüber dem freien Retinal verbunden. Das Retinal bildet mit dem Protein eine Schiffsche Base, die im Grundzustand protoniert vorliegt. Die positive Ladung wird in Richtung des Zyklohexenrings delokalisiert. Die Schiffsche Base steht mit verschiedenen Aminosäuren des Proteins in Wechselwirkung, die die Ladung des Retinals jedoch nicht direkt kompensieren (keine Salzbildung). Dadurch liegt das Absorptionsmaximum nicht wie

beim protonierten Retinal in Lösung bei 440 nm sondern bei 565 nm. Eine der fixierten Ladungen im Protein ist im Chromophormodell in Abb.49 durch B^- symbolisiert. Die Beobachtung, daß sich das Absorptionsmaximum durch Zugabe von Chlorid von 565 nm noch weiter nach 579 nm verschiebt, läßt vermuten, daß die protonierte Schiff'sche Base im Chromophor mit einem Chlorid direkt in Wechselwirkung tritt. Diese zusätzliche Rotverschiebung ist dadurch zu erklären, daß die positive Ladung des protonierten Retinals weiter in Richtung Zykhlohexenring delokalisiert wird. Deshalb sollte eine der Chloridbindungsstellen in der Nahe des Zykhlohexenrings liegen (Chloridbindungsstelle 1 in Abb.49).

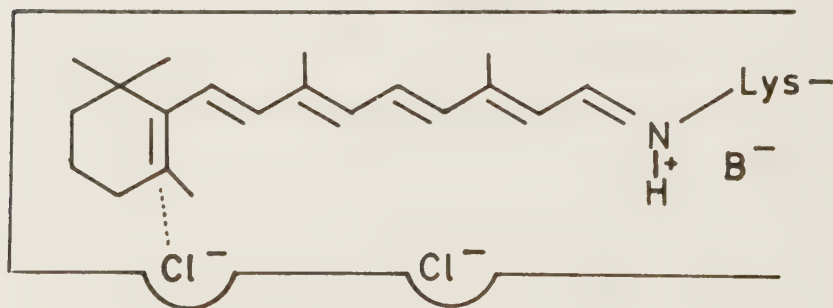


Abb.49 Modell des HR-Chromophors. B^- ist eine negativ geladene Aminosäure in Nachbarschaft zur Retinyleinheit, die mit der protonierten Schiff'schen Base in Wechselwirkung tritt (••••). Die Besetzung der Chloridbindungsstelle 1 verursacht die Verschiebung des Absorptionsmaximum von 565 nach 579 nm und hat eine Bindungskonstante für Chlorid von 50 mM. An die Position 2 bindet das Chlorid, das während des Photozyklus transportiert wird. Dieses tritt erst nach Isomerisierung des protonierten Retinals in die cis-Form mit dem Chromophor in Wechselwirkung.

Durch Besetzung der Chloridbindungsstelle 1 wird die

Deprotonierung wesentlich erschwert, sodaß HR_{410} in Anwesenheit von Chlorid erst bei hohen pH-Werten entsteht ($\text{pK}=9.6$ in 1M NaCl).

Nach Lichtanregung erfolgt eine Photoreaktion und daran angeschlossene Dunkelreaktionen, die den ersten Chlorid- transportschritt bewirken. Mit den Chromophorreaktionen des Photozyklus ist eine primäre Ladungstrennung verbunden, die weitere Transportschritte im Protein folgen läßt. Die erste Ladungstrennung erfolgt im BR durch Abgabe eines Protons vom Chromophor und Aufnahme eines neuen Protons von der anderen Seite der Membran nach erfolgter Chromophorisomerisierung. Da die Schiffssche Base selber kein Chlorid binden kann, muß der primäre Chloridtransportschritt im HR anders als der primäre Protonentransportschritt im BR ablaufen. Entweder kann der protonierte Chromophor Chlorid binden und dann isomerisieren oder der irreversible Schritt läuft an einer anderen Stelle des Proteins ab. Dabei kann aktiver Chloridtransport dadurch möglich werden, daß mehrere Konformationen des Proteins existieren, die sich in ihrer freien Energie unterscheiden. Das System wird durch Licht energetisiert und relaxiert durch den Transport eines Chloridions, ähnlich wie für das Bande 3 Protein in Erythrocyten postuliert (Knauf,1981). Mit Hilfe der verschiedenen Reaktionsmöglichkeiten ist es im HR vielleicht eher möglich als im BR, aufzuklären, mit welchen Schritten des Photozyklus Lichtabsorption, Isomerisierung, Ladungstrennung und Transport des Chloridions verbunden sind.

In Abb.50 ist ein Modell vorgeschlagen, das mit den

bisherigen Beobachtungen übereinstimmt, und einen Chloridtransport an Hand von Retinalisomerisierungen erklärt.

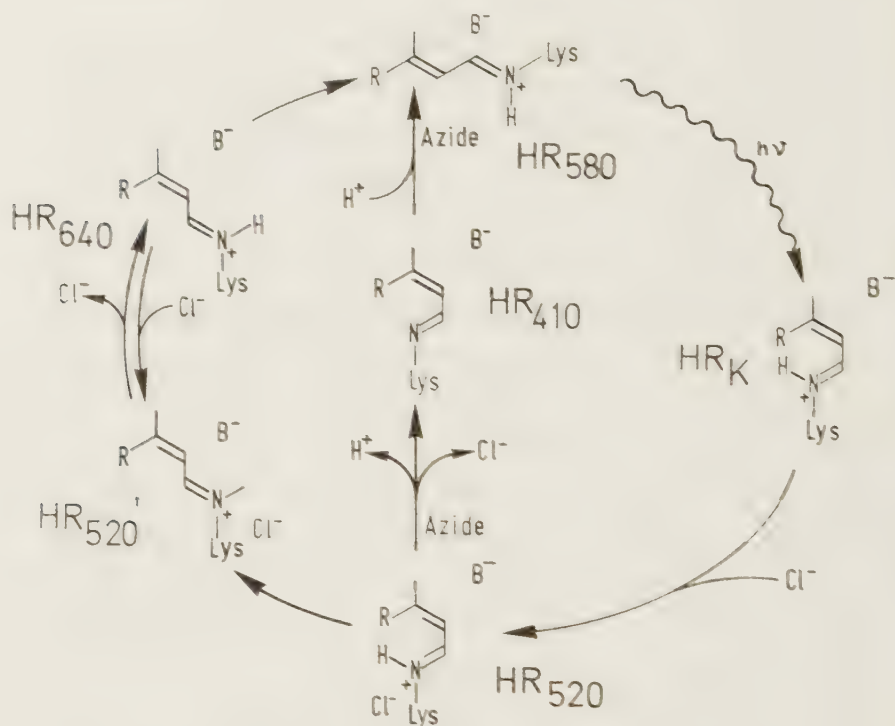


Abb. 50 Modell der Retinalisomerisierungen während des HR-Photolykklus einschließlich der von HR_{520} ausgehenden Verzweigung.

Die Photoreaktion erfolgt in 5 psec und ist von pH-Wert, Chlorid- und Azidkonzentration unabhängig. Wie im BR (Schulken & Tavan, 1978) konnte auch im HR bei Belichtung im angeregten Zustand eine konzertierte Drehung um die 13-14 Doppelbindung und um die 14-15 Einfachbindung ablaufen. Dadurch wird der positive Stickstoff von der Gegenladung B^-

Gegenladung Br wegbewegt und das langwellige Absorptionsmaximum verständlich. Wenn das Photoprodukt HR_{λ} als di-cis-Verbindung vorliegt, so kann dieses im Dunkeln nur über zwei getrennte Rotationen um die 13-14 und um die 14-15 Bindung zum Ausgangszustand $HR_{\lambda,0}$ reisomerisieren. Diese Drehungen laufen um so schneller ab, je mehr Einfachbindungscharakter die entsprechende Bindung aufweist. Drehungen um reine Doppelbindungen sind bei Raumtemperatur nicht möglich. Im protonierten Chromophor ist die positive Ladung nicht direkt kompensiert und in Richtung Zykllohexenring delokalisiert. Damit ist die Elektronendichte der 13-14-Bindung in Richtung 14-15-Bindung verlagert. Die 13-14-Bindung verliert zum großen Teil ihren Doppelbindungscharakter und eine Drehung kann in Millisekunden ablaufen (Schulten et.al., 1980; Schulten et.al., 1984). Diese Drehung erfolgt im BP auf dem Weg von BR_{λ} nach BR_0 und konnte beim HF auf dem Weg von $HR_{\lambda,0}$ nach $HR_{\lambda,0}$ ablaufen. Die Drehung um die 14-15-Bindung ist ebenfalls nur möglich, wenn die Bindung vorwiegend Einfachbindungscharakter hat. Das ist im unprotonierten Zustand der Fall. Deshalb erfolgt die Drehung um die 14-15-Bindung beim Bakteriorhodopsin im deprotonierten Chromophor (von $BR_{\lambda,2}$ nach $BR_{\lambda,2}'$). Eine deprotonierte Chromophorspezies wird im HR-Photozyklus aber nicht gefunden.

Im Gegensatz dazu ist die Reaktion von HR_{λ} nach $HR_{\lambda,0}$ mit großer Wahrscheinlichkeit mit einer Chloridaufnahme verbunden, da erstens diese Reaktion durch hohe Chloridkonzentrationen beschleunigt wird und zweitens die Blauverschiebung durch Annäherung einer negativen Gegenladung an

die protonierte Schiff'sche Base gut erklärt werden kann. Durch Annäherung eines Chloridions (von Bindungsstelle 2 in Abb.49 aus) an die protonierte Schiff'sche Base wird die positive Ladung am Stickstoff fixiert und eine Delokalisierung in Richtung des Cyklohexenrings des Retinals verhindert. Dabei wird die 14-15 Bindung zur reinen Einfachbindung und eine Rotation im msec-Bereich ebenfalls möglich (Tavan pers.Mitteilung). Eine Annäherung von Chlorid an den Stickstoff hat für die Ladungsverteilung im Chromophor also einen ähnlichen Effekt wie die Deprotonierung: Blauschift und Doppelbindungsfixierung.

Die Reaktion von $HR_{3,20}$ nach $HR_{4,40}$ ist eine Gleichgewichtsreaktion und wird bei hohen Chloridkonzentrationen in Richtung $HR_{3,20}$ verschoben. Dabei treten nach Belichtung nur relativ kleine $HR_{4,40}$ -Konzentrationen auf und die Rückbildung von $HR_{3,20}$ erfolgt langsamer als bei niedrigeren Chloridkonzentrationen. Da keine Deprotonierungsreaktionen auftreten, ist die Wechselzahl dieses, mit dem Chloridtransport verbundenen Photozyklus vom pH unabhängig.

Mit diesem Modell lassen sich sowohl die geforderten Isomerisierungsschritte als auch ein irreversibeler Chloridtransport über die Membran erklären. Weitere experimentelle Untersuchungen und theoretische Berechnungen (Tavan & Schulten) sind noch im Gange, um das Modell zu überprüfen und weiter zu verbessern.

Die Funktion des HR in der Zelle ist bis heute ebenfalls noch nicht geklärt. Vom BR ist bekannt, daß es bei Belichtung durch den Transport von Protonen ein Membranpo-

tential und einen pH-Gradienten aufbaut, die ATP-Synthese treiben und damit der Zelle ermöglichen, phototroph zu wachsen. HR baut durch den Chloridtransport einen Chloridgradienten und damit ebenfalls ein Membranpotential auf, das ATP-Synthese treiben kann. Wegen des damit verbundenen Protoneneinstroms in die Zelle, ist diese nicht in der Lage, mit HR alleine phototroph zu wachsen (Wagner et.al.,1981). In Abwesenheit von BR können die Protonen bei anaerobem Wachstum nicht wieder heraustransportiert werden und es akkumuliert HCl in der Zelle. Das HR kann nur zusammen mit BR zur Energetisierung der Zelle beitragen. Es ist also kein eigenständiges, sondern ein akzessorisches photosynthetisches Pigment.

Damit bleibt offen, wofür die Zelle HR benötigt.

Da Halobakterien in konzentrierten NaCl-Lösungen leben, ist während des Wachstums eine große Nettosalzaufnahme notwendig. Bei einem Membranpotential, das außen positiv und innen negativ ist, können Kationen über selektive Carrier (wie z.B. Natriumionen über den Natrium/Protonen-Antiporter) oder elektrophoretisch in die Zelle einströmen (z.B. K^+). Eine Anreicherung von Anionen in mM bis M Konzentrationen ist jedoch nur durch aktive oder elektrogene passive Transportsysteme möglich.

Bei anaerobem Zellwachstum wäre außer dem Chloridtransport durch das HR auch ein Chloridtransport durch andere Systeme wie z.B. einen elektrogenen Protonen/Chlorid-Symport, der durch das von BR aufgebaute Membranpotential getrieben wird, denkbar. Dabei müßten 2 Protonen zusammen

mit einem Chlorid transportiert werden.

Unter der Annahme, daß das HR für den Transport eines Chloridions gleich viel Energie benötigt wie das BR für den Transport eines Protons, wäre ein Transport von Chlorid über einen Chlorid/Protonen-Cotransport doppelt so energieaufwendig wie ein aktiver Transport über das HR.

Da eine Chloridkonzentration von 4M in der Zelle aufrechterhalten werden muß, ist für den Chloridtransport ein sehr großer Energiebedarf notwendig. Deshalb bringt ein optimierter Chloridtransport für Halobakterien Selektionsvorteile.

Eine erste halbquantitative Betrachtung soll dies verdeutlichen.

Eine Zelle des S9 Stammes enthält bei einem Zellvolumen von $1.4 \cdot 10^{-12}$ ml ca. $4 \cdot 10^5$ BR Moleküle. Eine Zelle des L-33 Stammes enthält ca. 5 % des BR-Gehaltes des S9 Stammes an HR und damit ca. $2 \cdot 10^4$ HR-Moleküle pro Zelle. Bei einer Photozykluszeit von 10 ms können also bei Lichtsättigung pro Stunde max. $7,2 \cdot 10^9$ Chloridionen in die Zelle transportiert werden. Bei der Zellteilung unter Verdopplung des Volumens und Aufrechterhaltung einer Konzentration von 4M Natriumchlorid sind ca. $1,5 \cdot 10^{-15}$ l x 4Mol/l x $6 \cdot 10^{23}$ Chloridionen/Mol = $3,4 \cdot 10^9$ Chloridionen notwendig. Das HR muß bei maximaler Geschwindigkeit mindestens 1/2 Stunde pumpen, bevor eine Zellteilung in 4M Chlorid erfolgen kann.

Diese Abschätzung läßt eine lichtgetriebene Chloridpumpe als für die Zelle durchaus sinnvoll erscheinen. Mit Sicherheit enthält die Zelle jedoch noch andere bis heute

unbekannte Chloridtransportsysteme, da Halobakterien unter aeroben Bedingungen auch im Dunkeln wachsen. Diese Systeme werden durch die Atmung getrieben, die sehr viel mehr Energie liefern kann als BR und HR.

Ob die Verzweigung des Photozyklus in Richtung HR_{410} physiologische Bedeutung hat, läßt sich noch nicht sagen. Verwunderlich ist, daß der Reaktionszyklus über HR_{410} sehr große Ähnlichkeiten mit dem in der Zelle beobachteten Photozyklus des SR aufweist. Die HR_{410} -Form könnte in der Zelle ebenfalls eine photosensitive Funktion haben. In der Zelle liegt zwar kein Azid vor, aber da bei der Bildung von HR_{410} Protonen abgegeben werden reichert sich HR_{410} bei negativem Innenpotential und alkalischem pH in der Zelle ebenfalls an. Durch die Aktivitäten der Atmung und des BR wird sowohl ein pH-Gradient (innen alkalisch) als auch ein Membranpotential (innen negativ) aufgebaut und damit durch Aktivitäten der Zelle selbst ein Blaulichtrezeptor geschaffen. Sollte dieser Blaulichtrezeptor von der Zelle für Regulation oder Phototaxis genutzt werden, so wären in der Zelle "Informationsebene" (Photosensitivität) und "energetische Ebene" (Schaffung eines Membranpotentials) in einem Protein verknüpft.

5. MATERIAL UND METHODEN

Alle nicht angegebenen Chemikalien (zur Analyse) wurden von der Firma Merck bezogen .

Chemikalien für die HPLC: TFA (Uvasol. Merck); Acetonitril (für die HPLC, Merck), Ameisensäure (Sigma)

Geräte: HPLC: 1. Knauer: zwei Pumpen FR 30

Gradientenformer

2. Gynkotek: Pumpe Modell 600

Gradientenformer: Model 2500

Photometer: Uvikord S (LKB) mit HPLC Zelle

SPD 2A (Shimadzu)

Uvikord 725 (Kontron)

Spektralphotometer: Kontron Uvikord 810

Aminosäureanalysator: Kontron Liquimat III

Radioaktivitätszähler: Kontron MR 300

5.1 Bakterienzucht und Anreicherung von PM

Die Halobakterienzellen wurden unter Standardbedingungen gezüchtet (Oesterhelt & Stoeckenius, 1974).

Es wurden folgende Stämme verwendet:

S 9 (BR⁺, HR⁺, SP⁺)

JW 5	(BO ⁺ , HO ⁺ , SO ⁺ , Ret ⁻)
L-33	(BR ⁻ , HR ⁺ , SR ⁺)
OD 2	(BR ⁻ , HR ⁺ , SR ⁺)
FLx 37	(BR ⁻ , HR ⁺ , SR ⁺)
L-07	(BO ⁻ , HO ⁺ , SO ⁺ , Ret ⁻)
Flx 3	(BR ⁻ , HR ⁻ , SR ⁺)

Belichtung der L-33 und OD2 Stämme mit zwei 80 W Neonröhren ergab eine 50 % höhere HR-Ausbeute (vgl. Steiner, 1983). Die Purpurmembraan wurde aus S9 Zellen nach dem Standardverfahren isoliert (Oesterhelt & Stoerkenius, 1974).

5.2 Präparation von Vesikeln

Zellen von 15 l Kulturmedium (OD₅₇₈: 1,2-1,4) wurden zentrifugiert (60 min, 3000 g, Stock), in 300 ml 4 M NaCl suspendiert, 15 min bei 14000 g zentrifugiert und in 300 ml 4 M NaCl suspendiert. In einem Beschallungshorn aus Glas wurde die Suspension in 150 ml Portionen im Eisbad mit einem Branson Sonifier B15 6 min lang beschallt (Puls 50, Stellung 9, große Beschallungsspitze).

Nach 15 min Zentrifugation bei 14000 g wurde der Überstand 30 min bei 200000 g zentrifugiert. Der Niederschlag wurde mit 300 ml 4M NaCl gewaschen und zum Schluß in 20 ml 4M NaCl resuspendiert. Die Proteinkonzentration wurde bestimmt (Warburg und Christian 1942) und auf 50 mg/ml eingestellt. Die Gesamtproteinmenge betrug 2 g. Der Halorhodopsingehalt in Vesikeln aus Retinal-negati-

ven Stammen kann durch spektroskopische Titration eines Aliquots mit Retinal bestimmt werden (Lanyi and Oesterhelt, 1982) und ergab bei Vesikeln aus L-07 Zellen 1,0 nMol/10 mg.

5.3 Rekonstitution und Reduktion von HR in L-07 Vesikeln

50 nMol [^3H]-Retinal (5 Ci/mMol) (Lanyi & Oesterhelt, 1982) in Methanol (1 mM) wurden zu einer Vesikelsuspension mit einem Proteingehalt von 1 g gegeben und 16 h bei RT gerührt. Das rekonstituierte HR (SR) wurde in Gegenwart von 1 % Cyanborhydrid, 0.5 M Ammoniumacetat, pH 5 zum Retinylprotein reduziert. Die Vesikel wurden zweimal mit 4 M NaCl gewaschen (Zentrifugation 30 min, 200000 g) und in 40 ml 4 M NaCl resuspendiert.

5.4 Gesamtmembranfraktion

Die Vesikel werden nach Zugabe von 5 mg DNase I (Rinderpankreas Grade II, Boehringer) gegen 5 l H_2O über Nacht dialysiert.

Das Lysat wurde 1 Stunde bei 10 °C zentrifugiert (20000g) und das Pellet mit einem Potter (Elvehjem Homogenizer) in 0.1 M NaCl Lösung resuspendiert. Nach nochmaligem Zentrifugieren wurde die GMF in 30 ml Wasser aufgenommen (Proteingehalt: 50 mg/ml).

5.5 Denaturierte Isolierung von einbandigem HR

a) Gelfiltration auf AcA 44 Ultrogel

15 ml Gesamtmembranfraktion (50 mg/ml) wurden mit 4 ml 20 % SDS, 0,1 % ME gemischt und drei Stunden bei RT rerührt. Nach 1 h Zentrifugation bei 200000 g und 20 °C wurde der Überstand auf eine AcA 44 Ultrogel-Säule (5x90 cm) aufgetragen, die mit 4 % SDS, 1 mM EDTA äquilibriert war (die SDS-Lösung wurde durch eine 0,25 µm Milliporemembran filtriert, siehe auch Steffens und Buse, 1976). Protein wurde bei einem hydrostatischen Druck von 90 cm mit einer Geschwindigkeit von 1,6 ml/min eluiert, Fraktionen von 12 ml gesammelt und die Radioaktivität gemessen. Das RP eluierte vor den niedermolekularen radioaktiven Komponenten, die immer als Folge von unvollständiger Rekonstitution auftraten.

b) Hydroxylapatit-Chromatographie

SDS-Hydroxylapatit-Chromatographie wurde bei konstanter Temperatur (22 °C) ausgeführt (vgl. Moss & Rosenblum, 1972). Die RP-Fraktionen der Gelfiltrationssäule wurden vereinigt und direkt auf eine Hydroxylapatitsäule (1,6x20 cm) gegeben (Biogel HT Bio-Rad), die mit drei Säulenvolumen 10 mM Natriumphosphat pH 6,4, 0,1 % SDS, 0,01 % Natriumazid, 1 mM EDTA äquilibriert war. Nach Waschen der Säule mit 30 ml Äquilibrierungspuffer wurde das Protein mit einem Gradienten von 200-500 mM Natriumphosphat in 35 min bei einer Geschwindigkeit von 0,5 ml/min eluiert. Die RP-Fraktionen

(je 10 ml) wurden gesammelt, bei 4°C gegen 1 mM EDTA dialysiert und in einer Amiconzelle (YM-10 Filter) auf ein Endvolumen von 500 µl konzentriert.

c) Präparative SDS-PAGE

Die präparative SDS-PAGE wurde mit einer LKB Uniphor 7900 Aparatur nach Waehnelt (1971) ausgeführt. Die konzentrierte HR-Probe (10 mg in 500 µl) wurde durch Zugabe von 500 µl eines Puffers, der 4 % SDS, 8 M Harnstoff, 15 mM Tris-HCl pH 7.8, 2 % ME, 10 % Succrose und 0.01 % Bromphenolblau enthielt, gelöst und aufgetragen. Das Trenngel enthielt 12 % Acrylamid und 0.32 % Bisacrylamid. Das Gel war 10 cm lang und hatte einen Durchmesser von 2,2 cm. Das Sammelgel enthielt 2,5 % Acrylamid und 0.62 % Bisacrylamid und hatte eine Länge von 1 cm. Die Gelbereitung wurde exakt nach Waehnelt ausgeführt, außer einem Zusatz von 3 M Harnstoff. Der Kathodenpuffer bestand aus 50 mM Tris/Glycin pH 8,9 in 0,1 % SDS, der Anoden- und Elutionspuffer enthielt 100 mM Tris/HCl pH 8,1 in 0,1 % SDS. Die Elektrophorese begann bei 6 mA (200 V) und wurde nach 3 Stunden bei einem konstanten Strom von 10 mA für 20 Stunden fortgesetzt, wobei die Spannung bis auf 600 V anstieg. Die Elutionsgeschwindigkeit war 0.2 ml/min, die Fraktionsgröße 5 ml. Die Fraktionen, die RP enthielten, wurden vereint, dialysiert und konzentriert (wie unter b). Aus 10 l Kultur wurden ca 500 µg reines HR erhalten.

5.6 Denaturierte Isolierung von zweibandigem HR

a) Präparation der Tween-gewaschenen Membran

Die Gesamtmembranfraktion (20ml, 20 mg/ml) aus 10 l Zellen wurde mit 40 ml 50 mM MOPS-Puffer (Sigma) pH 7, 5 % Tween 20 gemischt (Protein:Detergens Verhältnis 1:5). Die Suspension wurde bei RT 60 min lang im Dunkeln gerührt bis die Lösung klar war. 25 ml Aliquote wurden in Becher eines TST 28 Ausschwingrotors gegeben und mit 6 ml 25 % Sucrose und drei ml 45 % Sucrose unterschichtet (3 ml/min). Nach 13 h Zentrifugation bei 80000 g und 10°C wurde das rote Material im Bereich der Sucrose gesammelt und mit 10 mM MOPS-Puffer pH 7 auf 50 ml verdünnt. Nach Zentrifugation (200000g, 60 min, 10°C) wurde die Membran noch zweimal mit 10 mM MOPS-Puffer pH 7 gewaschen und am Ende mit diesem Puffer auf 10 ml Volumen gebracht. (Proteinkonzentration 25 mg/ml).

Gelfiltration auf AcA 44

10 ml Tweenmembran (25 mg/mg) aus 10 l Kultur werden nach Zugabe von 2,5 ml 20 % SDS drei Stunden bei RT gerührt. Nach 30 min Zentrifugation bei 200000 g und 22 °C wird der Überstand auf eine Ultrogel AcA 44 Säule (5x120 cm) aufgetragen, die mit 4 % SDS, 1 mM EDTA äquiliibriert ist (vgl. Abb.10). Nach 1000 min werden Fraktionen von 12 ml gesammelt und auf einem SDS-Gel analysiert. Die Fraktionen, die ausschließlich 20 KD Material enthalten, werden vereinigt und auf eine Hydroxylapatitsäule (2.6x4 cm)

aufgetragen (äquibriert wie unter 4.5b) und mit 30 ml 10 mM Natriumphosphat pH 6.4 , 0,1 % SDS gewaschen. Das HR wird mit 500 mM Phosphat pH 6.4 , 0,1 % SDS eluiert, gegen Wasser dialysiert und lyophilisiert. Restliches SDS wird nach der Methode nach Hendersen et.al.(1979) mit Solvenssystem A extrahiert. Aus 10 l erhält man ca. 6 mg reines HR.

5.7 Native Isolierung von HR

Natives HR wurde aus den Stämmen L-33 und OD2 (Spudich & Spudich,1982) nach der Methode von Steiner und Oesterheldt (1983) isoliert (Schema 1).Dabei wurden zwei Änderungen vorgenommen: Erstens wurde die Tweenmembran wie unter 4.7 isoliert und zweitens die Hydroxylapatitchromatographie in Gegenwart von 5 mM Phosphat ausgeführt, da das HR in Abwesenheit von Phosphat teilweise gebunden wurde, was die Ausbeute bis zu 30 % erniedrigte. Die Gegenwart von Phosphat hat auf die Reinheit des Endproduktes keinen Einfluß.

5.8 Aminosäureanalysen

Für die Hydrolyse wurden 1-5 nMol lyophilisiertes salzfreies Protein oder Peptid, nach folgenden Methoden weiterverarbeitet:

a: Nach Zugabe von 0.5 ml über SnCl_2 destillierte 6N HCl wurde im zugeschmolzenen, evakuierten Glasrohr 24 h bei 110 °C hydrolysiert. Die Säure wurde vor dem Aufnehmen in

Probenpuffer im Vakuumexsikkator über KOH entfernt.

b: Nach Zugabe von 50 μ l 4 M Methansulfonsäure (Fluka p.a.), die 2 mg/ml Indolessigsäure enthielt (frisch zugegeben), folgten 24 h Hydrolyse.

Reine Ameisensäure wurde mit Wasser und 30 %igem H_2O_2 im Verhältnis 8:1:1 gemischt und nach 1 h das Protein 4 h bei 0°C mit dieser Mischung inkubiert. Dann wurde nach Zusatz von 1 ml Wasser lyophilisiert und 24 h mit 6 N HCl bei 110°C hydrolysiert.

5.9 Produktion von Antikörpern

Antikörper gegen BR wurden in Kaninchen produziert, indem 550 ng elektrophoretisch gereinigtes BR (wie unter 4.5c) mit komplettem Freud'schen Adjuvans emulgiert und subcutan injiziert wurde. Gebustert wurde 4 mal mit 200 μ g BR in inkomplettem Adjuvans. Gereinigtes HR (400 μ g) wurde nach der gleichen Methode in ein zweites Tier injiziert. Nach einem Monat wurde wöchentlich geboostert (4 mal). Für die Antikörperproduktion gegen einbandiges HR wurde aus L-07 Zellen isoliertes HR verwendet. Für Antikörper gegen zweibandiges HR wurde aus L-33 Zellen isoliertes HR verwendet. Zum Test wurden RF enthaltende Proteinfractionen oder reines HR bzw. BR auf Gradientengelen (9-24 % Acrylamid nach Laemmli, 1970) aufgetrennt und das Protein auf Nitrozellulose transferiert (30V, 200-300 mA, 4h, nach Towbin et.al., 1979). Der Transfer auf Nitrozellulose läßt sich durch Amidoschwarzanfärbung der Proteine kontrollieren.

Als Indikator wurde Fluorescamin markiertes α -Hase IgG aus Ziege (Biomerieux) in 1:100 Verdünnung verwendet (Oesterhelt & Krippahl, 1983). Die erhaltenen Seren konnten in einer Verdünnung 1:25 (HR aus L-07), 1:250 (HR aus L-33 und BR aus S9) oder 1:10 (natives HR elektrophoretisch nachgereinigt) verwendet werden.

5.10 Fluorographie

Nach der SDS-PAGE wurden die Gele mit radioaktiven Proben mit einem flüssigen Scintillator (En³Hance, New England Nuclear) imprägniert, auf einem Filterpapier (Whatman 3MM) getrocknet und auf einem Kodak X-ray 90 Film bei -70°C exponiert (1 Woche für 200000 cpm ³H/Bande). Nitrozellulosestreifen werden vor der Exposition 30 min lang mit 1 M Natriumsalicylat imprägniert.

5.11 BrCN-Spaltung

300 nMol lyophilisiertes HR wurden in 2,8 ml konzentrierter Ameisensäure gelöst und mit 1,2 ml Wasser auf eine Säurekonzentration von 70 % verdünnt. Nach Zugabe von 60 mg festem BrCN wurde 2 min mit Stickstoff gespült. 5 h bei RT (22°C) im Dunkeln inkubiert. 8 ml Wasser zugegeben und lyophilisiert.

5.12 Jodosobenzoesäurespaltung und Fraktionierung der Peptide

200 nMol natives HR (über die Absorption bei 580 nm bestimmt, $\epsilon_{580} = 50000$, Steiner & Oesterhelt, 1982) in 1 % OG, 1 M NaCl werden gegen 1 l Wasser dialysiert und lyophilisiert. Restliches Detergens wird mit Aceton/Ammoniak/TCA entfernt (Sumper et.al., 1976). 66 mg Jodosobenzoesäure (Fluka) und 5.4 mg p-Kresol (Fluka) werden in 600 μ l 4 M Gua HCl (Pierce), 80 % Ameisensäure 3 h bei RT vorinkubiert (Mahoney et.al., 1981). 200 nMol trockenes HR werden in 800 μ l 4 M Gua- HCl, 80 % Ameisensäure gelöst und 136 μ l Reagenz zugegeben (Protein:Reagenz 1:3 w/w) und 24 h bei RT im Dunkeln inkubiert.

Nach Zentrifugation (10 min, 10000g, 10°C) wird der Überstand auf eine Säule (1,4x120cm), die mit LH 60 Material (Pharmacia) gefüllt und mit 88 % Ameisensäure/Ethanol 3/7 äquilibriert ist, aufgetragen (vgl. Huang et.al., 1982). Laufgeschwindigkeit 7-10 ml/h, 2 ml Fraktionen). Die drei Hauptgipfel werden durch Ninhydrinanfärbung (Biewald & Buse, 1982) identifiziert und lyophilisiert.

5.13 Limitierte Proteolyse mit V8-Protease

700 μ g denaturiertes HR in 40 μ l Wasser werden mit 140 μ l Staphylococcus aureus V8-Protease (1 mg/ml, Miles Lab.Inc.) in Probenpuffer (nach Cleveland et.al., 1977) bei 37 °C

inkubiert. Nach 0,1,2,4,6,8 Stunden werden je 30 μ l entnommen, je 3 μ l 20 % SDS zugegeben. 2 min bei 100°C gekocht, eingefroren und nach Bedarf aufs Gel aufgetragen. BR wurde nach Steiner (1980) gespalten. Proteolysen von reduziertem HR oder reduzierten Tweenmembranen wurden analog durchgeführt. Die Proben wurden jedoch nicht gekocht, sondern 10 min bei 45°C inkubiert bevor sie auf das Gel aufgetragen werden. Um die Fluoreszenz sichtbar zu machen, wurden 300 μ g (260/280) Tweenmembran aufgetragen.

5.14 HPLC von BrCN-Peptiden

Zum lyophilisierten Peptidgemisch (300 nMol) werden 500 μ l 10 % Ameisensäure gegeben, 2 min gut gemischt, zentrifugiert (5 min, 10T) und die kleinen Peptide im Überstand auf einer HPLC Säule Lichrosorb RP 18 10 μ m (4,6x250 mm, Merck) getrennt.

Elutionsbedingungen: 6 min 95 % A, 5 % B

5-50 % B in 50 min

Laufmittel A: 0,16 % TFA in Wasser

B: 0,07 % TFA in Acetonitril

A und B werden mit TFA auf die gleiche OD bei 220 nm titriert.

Fluß: 2 ml/min Detektion bei 220 und 280 nm .

Der Extraktionsniederschlag wird in 200 μ l konzentrierter Ameisensäure aufgenommen und auf der gleichen Säule getrennt.

Elutionsbedingungen: 5-50 % B in 10 min, 50-95 % B in 60

min.

Laufmittel A: 0.16 % TFA in Wasser

B: 0.16 % TFA in 2-Propanol

Fluß: 1,5 ml/min Detektion bei 280 nm

5.15 Extraktion der Retinalisomere aus der Bindungsstelle

Die Retinalisomere aus verschiedenen HR-Proben werden durch mehrmalige Extraktion der Proben (200-500 μ l) mit dem gleichen Volumen Isopropanol/Hexan (1:1) im Dunkeln isoliert. Die wässrige Phase wird noch zweimal mit dem gleichen Volumen Hexan extrahiert. Die vereinigten organischen Lösungen werden sofort durch eine ca. 4 cm hoch mit Natriumsulfat gefüllte Pasteurpipette filtriert und mit 500 μ l Methanol nachgespült. Das organische Lösungsmittel wird mit Stickstoff verblasen, die Probe in 20 μ l Isopropanol aufgenommen und auf einer Si 60 HPLC-Säule isokratisch aufgetrennt. Laufmittel: Cyclohexan/Ether=80/20 (Gärtner, 1981). Das HR 410 nm Photoprodukt wurde bei -5°C sofort nach dem Ausschalten des Lichtes extrahiert.

5.16 Bildung, Extraktion und Auftrennung der Retinaloxime

10 nMol natives HR (BR) in 1 % OG, 1 M NaCl werden mit 250 μ l 2 M Hydroxylamin pH 7 30 min lang vor einer Kinolampe (900 W) bei 10 °C reduziert. Die Probe wurde mit 700 μ l Ethanol denaturiert und die Retinaloxime nach 10 min mit

700 μ l Hexan extrahiert. Die organische Phase wurde über eine 4 cm lange Natriumsulfatsäule getrocknet, das organische Lösungsmittel mit Stickstoff verblasen und die Probe in 20 μ l Ethanol aufgenommen. Die Dünnschichtchromatographie wurde nach v.Planta u.a. (1962) ausgeführt und die Retinaloxime durch ihre Fluoreszenz nachgewiesen.

5.17 Halorhodopsininduktion

L-07 Zellen wurden in 2 l Erlenmeyerkolben bei 40°C und 100 rpm gezüchtet. Je 30 μ l einer ethanolischen Retinallösung (1mM) wurden nach 0,24,48,72 und 82 Stunden zugegeben, nach 98 Stunden 150 μ l. Bei diesen Zeiten wurden je 10 ml Kultur entnommen und die HR Aktivität nach Oesterhelt (1982) bestimmt.

5.18 Analytische Boranatreduktion von Membranfraktionen

125 μ g Tweenmembran (100 μ l) werden mit 15 μ l 10 % wässriger Natriumboranolösung gemischt und 30 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Die Membranen werden mit 100 μ l 10 mM MOPS-Puffer pH 7 gewaschen und durch Zentrifugation gesammelt (15 min bei 160000g in der Airfuge, Beckmann). Das Pellet wird in 50 μ l Wasser und 50 μ l Probenpuffer (Laemli,1970) gelöst, 15 min bei 40°C inkubiert und durch SDS-PAGE (9-24 % Acrylamid) aufgetrennt. Unter diesen Bedingungen wird nur HR zum Retinylprotein reduziert.

5.19 Herstellung von schwarzen Lipidmembranen

Optisch schwarze Membranen mit einer Fläche von $5 \times 10^{-3} \text{ cm}^2$ wurden in einer Teflonzelle gebildet (Bamberg et.al., 1979), die mit der geeigneten Elektrolytlösung gefüllt war. Die Temperatur wurde bei 25°C gehalten. Die membranbildende Lösung enthielt 1,5 % (w/v) Diphytanoyllecithin und 0,025 % (w/v) Octadecylamin gelöst in n-Decan. Das zweite Lipid wird zugesetzt, um eine positive Oberflächenladung zu erhalten, die die Adsorption der Membranfraktion ermöglicht (Dancshazy und Korvaly, 1976). Die Zelle mit der Membran war mit einem externen Meßkreis durch Silber/Silberchloridelektroden verbunden. Um artifizielle Photoeffekte zu vermeiden, wurden die Elektroden über Salzbrücken von der Meßzelle getrennt. Licht einer 250 W Halogenwolframlampe (Zeiss) bestückt mit einem Wärmeschutzfilter (Balzers, Lichtenstein) wurde auf die Membran fokussiert. Der Lichtstrahl passierte zuerst das vordere Kompartiment der Kuvette, wogegen die Tweenmembran oder die HR-Vesikel in das hintere Kompartiment gegeben wurden.

Ionophore und Salze wurden auf beiden Seiten zugegeben.

5.20 Aktionsspektren der HR induzierten Photoströme

Die Aktionsspektren der HR induzierten Photoströme wurden mit einer Serie Schmalbandinterferenzfilter bestimmt (Balzers B 40, 10 nm Halbwertsbreite). Die Lichtintensität

in der Ebene der Membran wurde mit einem geeichten Joulemeter bestimmt.

5.21 Herstellung von Halorhodopsin-Liposomen

80 mg Asolectin (Sigma) in 2 ml 1 M NaCl werden ca. 30 min bei 30°C in einem Beschallungsbad (Branson) beschallt, bis die Trübung der Lösung nicht weiter abnahm. Zu 50 μ l dieser Vesikelsuspension wurden 30 μ l HR (80 nMol/ml) in 1 % OG, 1M NaCl gegeben und mit 1M NaCl auf 200 μ l aufgefüllt. Nach 2 h wurde die Lösung mit 1M NaCl auf 3 ml verdünnt.

50 μ l dieser HR-Liposomensuspension wurde für ein Experiment an der künstlichen Membran eingesetzt.

5.22 Blitzlichtphotolyse

Der experimentelle Aufbau für die Blitzlichtphotolyse war wie beschrieben (Vogel et.al.,1983). Zur Messung der Absorptionsänderung wurde Licht einer stabilisierten Xenonlampe (Garching Instruments, Modell LAX 1530) durch eine geeignete Linsenkombination auf die Probe focussiert. Für die Detektion bei 610 nm wurde Licht mit $\lambda > 530$ nm, für die Detektion bei 490 nm wurde Licht mit $\lambda > 460$ nm und für die Detektion bei 410 nm wurde Licht mit $\lambda = 410 + 10$ nm (Interferenzfilter mit 30 % Transmission bei 410 nm) verwendet. Für die Messung bei 610 und 490 nm wurde das

Licht durch Neutralglasfilter auf 25 % abgeschwächt. Als Probe wurde natives HR (20 nMol/ml) in 1 M NaCl, 1 % OG, 10 mM MOPS pH 7,15 verwendet. Zum Einstellen der Azidkonzentration wurde eine 5 M Natriumazidlösung (pH 7) verwendet. Die transienten Absorptionsspektren wurden mit einer polychromatischen Blitzlichtapparatur aufgenommen (Uhl et.al., 1984).

6. LITERATUR

Bamberg, E., Apell, H.-J., Dencher, N.A., Sperling, W., Stieve, H. and Laeuger, P. (1978) *Biophys. Struct. Mech.* 5, 277-292.

Bamberg, E., Dencher, N.A., Fahr, A., Heyn, M.P. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 7502-7506.

Bamberg, E., Hegemann, P., Oesterhelt, D. (1984) *Biochim. Biophys. Acta*. (in press)

Bamberg, E., Hegemann, P., Oesterhelt, D. (1984) *Biochem.* (submitted)

Bayley, H., Huang, K-S., Radhakrishnan, R., Ross, A.H., Tahagaki, Y. and Khorana, G. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 2225-2229.

Bergmeyer, J., Straub, J., Oesterhelt, D. in *High Performance Liquid Chromatography in Protein and Peptide Chemistry*, F. Lottspeich, A. Henschen, K.-P. Hupe (eds) W. de Gruyter, Berlin, pp. 315-324 (1981)

Biewald, R. and Buse, G. (1982) *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 363, 1141-1153.

Bogomolni, R.A., Baker, R.A., Lozier, R.H. and Stoeckenius, W. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 440, 68-88.

Bogomolni, R.A., Spudich, J.L. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,

79,6250-6254.

Bornstein,P. and Balian,G. (1977) Meth.Enzymol. 47,132-145.

Braiman,M. and Mathies,R. (1980) Biochem. 19,5421-5428.

Casadio,R., Gutowitz,H., Moverly,P., Taylor,M. and Stoeckenius (1980) Biochim.Biophys.Acta. 590,13-23.

Cleveland,D.W. (1977) J.Biol.Chem. 252,1102-1106.

Dancshazy,Z. and Karvaly,B. (1976) FEBS Lett.72,136-138.

Dayhoff,M.O.,Schwarz,R.M. and Orcutt,B.C. (1979) Atlas of Protein Sequence and Structure, Vol.5.,Suppl. 3,345-362.

Didzdaroglu,M. and Simic,M.G. (1980) J.Chromat. 195,119-126.

Donan,A. and Caplan,S.R. (1976) Biochem.Biophys.Acta 432,133-144.

Falke,I.J., Chan,S.I., Steiner,M., Oesterhelt,D., Towner,P. and Lanyi,J.K. (1984) J.Biol.Chem. (submitted)

Fontana,A., Dalzoppo, D.,Grandi,C. and Zambonin,M. (1983) Meth.Enzymol. 91,111-118.

Fontana,A., Savige,W.F. and Zambonin in Meth. in Peptide and Protein Sequence Analysis (C.Birr ed.) p.309. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam (1980).

Fontana,A., Vita,C. and Taniolo,C. (1973) FEBS Lett. 32,139.

Gärtner,W (1981) Dissertation Universität Würzburg

Gerber,E.G., Gray,C.P., Wildenauer,D. and Khorana,H.G.(1977)

Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 74,5426-5430.

Gerber,E.G. and Khorana H.G. (1982) Meth.Enzymol. 88,56-74.

Gödecke,M.E. (1976) Diplomarbeit Universität Würzburg.

Green,R.V. and Lanyi,J.K. (1979) J.Biol.Chem. 254,10986-10994.

Gross,E. (1967) Meth.Enzymol. 11,238-255.

Hartmann,R., Sickinger,H.D. and Oesterhelt,D. (1977) FEBS Lett. 82,1-6.

Hegemann,P., Steiner,M. and Oesterhelt,D. (1982) EMBO J. 1,1177-1183.

Henderson,L.E., Oroszlan,.S. and Königsberg,W. (1979) Anal.Biochem. 93,153-157.

Herrmann,T.R. and Rayfield,G.W. (1978) Biophys.J. 21,111-125.

Hess,B. and Kuschmitz,D. (1979) FEBS Lett. 100,334-340.

Hess,B., Korestein,R. and Kuschmitz, D. (1978) In Energetics and Structure of Halophilic Microorganisms (S.R.Caplan and M.Ginzburg, eds.), pp.89-108, Elsevier/North-Holland, Amsterdam.

Hildebrand,E. and Dencher,N. (1975) Nature (London) 257,46-48.

Honig,B., Dinur,U., Nakanishi, K., Balogh-Nair,V., Gawinowicz,M.A., Arnaboldi,M. and Motto, M. (1979)

J.Am.Chem.Soc. 7084-7086.

Honig,B., Ebrey,T., Callender,R.H., Dinur,U. and Ottolenghi,M. (1979) Proc.Natl.Acad.Sci. USA 78,4068-4072.

Huang,H.V., Bond,M.W., Hunkapiller,M.W. and Hood,L.E. (1983) Meth,Enzymol. 91,318-325.

Huang,K.S., Radhakrishnan,R., Bayley,H. and Khorana,H.G. (1982) J.Biol.Chem. 257,13616-13623.

Keszthelyi,L. and Ormos,P. (1980) FEBS Lett. 109,189-193.

Ketterer,B., Neumke,B. and Lauser,P. (1971) J.Membr.Biol. 5,225-245.

Khorana,H.G., Gerber,G.E., Herlihy,W.C., Gray,C.P., Anderegg,R.I., Nihei,K. and Biemann,K. (1979) Proc.Natl. Acad.Sci.USA. 76,5046-5050.

Knauf,P.A. in Membranes and Transport, Martosi (ed.) Vol.2. p.441 Plenum Press New York and London (1982).

Laemmli,U.K. (1970) Nature 227,680-685.

Landon,M. (1977) Meth.Enzymol. 47,145-149.

Lanyi,J.K. (1978) Microbiol.Rev. 42,682-706.

Lanyi,J.K. and Mac Donald,R.E. (1976) Biochem.15,4608-4614.

Lanyi,J.K. and Oesterhelt,D. (1982) J.Biol.Chem.,257,2674-2677.

Lanyi,J.K. and Weber,H.J. (1980) J.Biol.Chem. 255,243-250.

- Lemke,H.-D. and Oesterhelt,D. (1981) FEBS Lett.128,255-260.
- Lozier,R.H., Bogomolni,R.A., Stoeckenius,W. (1975) Biophys.J.15,955-962.
- Mahony,W.C., Smith,P.K. and Hermodsen,M.A. (1981) J.Biochem. 20,443-448.
- Matsumo-Yagi,A. and Mukohata,Y. (1977) Arch.Biochem.Biophys. 199,297-303.
- Moss,B. and Rosenblum,E. (1972) J.Biol.Chem. 247,5194-5198.
- Motto,M.G., Sheves,M., Tsujimoto,K., Balogh-Nair,V. and Nakanishi,K. (1980) J.Am.Chem.Soc. 102,7947-7949.
- Mukohata,Y., Matsumo-Yagi,A. and Kaji,Y. (1980) in Morishita,H. and Musini,M. (eds.), Saline Environmnt, Bus.Centr.Acad.Sci., Tokyo, pp. 31-37.
- Mukohata,Y. and Kaji,Y. (1981) Arch.Biochem.Biophys. 206,72-76.
- Nakanishi,K., Bagog-Nair,V., Arnaldi,M., Tsuimoto,K. and Honig,B. (1980) J.Am.Chem.Soc. 102,7945-7947.
- Oesterhelt,D. (1975) Ciba Found.Symp. 31, 147-167.
- Oesterhelt,D. (1982) Nova acta Leopoldina NF 55, Nr 264,21-38.
- Oesterhelt,D. (1982) Meth.Enzymol. 88,10-17.
- Oesterhelt,D. and Krippahl,G (1983) Ann.Microbiol.(Inst. Pasteur) 134B,137-150.

- Oesterhelt,D., Meentzen,M. and Schuhmann,L. (1973) Eur.J.Biochem. 40,453-463.
- Oesterhelt,D. and Stoeckenius,W. (1971) Nat.New.Biol. 233,149-152.
- Oesterhelt,D. and Stoeckenius,W. (1974) Methods Enzymol. 31A,667-678.
- Ogurusu,T.,Maeda,A.,Sasaki,N. and Yoshizawa,T. (1982) Biochim.Biophys.Acta 682,446-451.
- Orcutt,B.C.,Dayhoff,M.O. and Baker,W.C. (1982) NBR Report 820501-08710 Programm Version 1.
- Ovchinnikov,Yu.A., Abdulaev. N.G., Feigina,M.Yu., Artamonov,I.D., Zolotarev,A.S., Miroshnikov,A.I., Martynov,V.I., Kostina,M.B., Kudelin,A.B. and Bogachuk,a.s. (1982) Bioorg.Khim.8, 1011-1014, 1424-1427.
- Ovchinnikov,Yu.A. (1982) FEBS Lett. 148,179-191.
- Patchornik,A., Lawson,W.E., Gross,E. and Witkop,B. (1960) J.Am.Chem.Soc. 82,5923.
- Polland,H.-J., Franz,M.A., Zinth,W., Kaiser,W., Hegemann,P. and Oesterhelt,D. (1984) Biophys.J. (submitted)
- Reppe,K. (1970) in Houben-Weyl, Meth.Org.Chem. (Müller,E. ed.) Vol.V/1d,pp.7-31, Thieme Verlag Stuttgart.
- Righetti,P. and Secchi,L. (1972) J.Chromatogr. 72,165-175.
- Schneider,F. (1978) Naturw. 65,376-381.

- Schobert, B. and Lanyi, J.K. (1982) J. Biol. Chem. 257, 10306-10313.
- Schobert, B., Lanyi, J.K. and Cragoe, E.I. (1983) J. Biol. Chem. 258, 15158-15164.
- Schreckenbach, T., Walkhoff, B. and Oesterhelt, D. (1977) Eur. J. Biochem. 76, 499-511.
- Schreckenbach, T., Walkhoff, B. and Oesterhelt, D. (1978) Biochem. 17, 5353-5359.
- Schreckenbach, T., Walkhoff, B. and Oesterhelt, D. (1978) Photochem. Photobiol. 28, 205-211.
- Schulten, K. and Tavan, P. (1978) Nature 272, 85-86.
- Schulten, K., Dinur, U. and Honig, B. (1980) J. Chem. Phys. 73, 3927.
- Schulten, K., Schulten, Z. and Tavan, P. (1984) in: International Conference on Biological Membranes, Crans sur Siere, Helmreich (ed) (in press).
- Sheves, M. and Nakanishi, K. (1983) J. Am. Chem. Soc. 105, 4033-4039.
- Sheves, M., Nakanishi, K. and Honig, B. (1979) J. Am. Chem. Soc. 101, 7086-7088.
- Sperling, J.L., Carl, P., Rafferty, C.H.N. and Dencher, N.A. (1977) Biophys. Struct. Mech. 3, 79-94.
- Sperling, J.L. and Schimz, A. (1980) Biophys. Struct. Mech. 6, 165-169.

Spudich,E.N. and Spudich,J.L. (1982) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 79,4308-4312.

Steffens,G. and Buse,G. (1976) Hoppe-Seyler's Z.Physiol. Chem. 357,1125-1137.

Steiner,M. (1980) Diplomarbeit Universität München.

Steiner,M. (1983) Dissertation Universität München.

Steiner,M. and Oesterhelt,D. (1983) EMBO J. 2,1379-1385.

Steiner,M., Oesterhelt,D., Aviki,M. and Lanyi,J.K. (1983) J.Biol.Chem. im Druck

Stoeckenius,W. and Bogomolni,R.A. (1982) Ann.Rev.Biochem. 52,587-615.

Stoeckenius,W., Lozier,R.H. and Bogomolni,R.A. (1979) Biochem.Biophys.Acta 505,215-278.

Sumper,M. and Herrmann,G. (1978) Eur.J.Biochem. 89,229-235.

Tamita,M and Marchesi,V. (1976) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 72,2964-2968.

Towbin,H., Staehlinger,T.and Gordon,J. (1979) Proc.Natl. Acad.Sci.USA,76,4350-4354.

Taylor,M.E., Bogomolni,R.A. and Weber,H.J. (1983) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 80,6172-6176.

Tsuda,M., Glaccum,M., Nelson,B. and Ebrey,T. (1980) Nature 287,361-363.

Uhl,R., Meyer,B. and Desel,H. (1984) J.Biochem.Biophys.Meth.

(in press)

Vogel, J., Knoth, G., Melzing, M., Ciniel, E., Schneider, S. and Dörr, F. (1983) *Ber. Bunsen Ges. Phys. Chem.* 87, 391-396.

v. Planta, C., Schreiber, U., Chopard-dit-Jean, L., Rüegg, R., Kafler, M. and Isler, O. (1962) *Helv. Chim. Acta* 45, 548-561.

Waehnel, T. V. (1971) *Anal. Biochem.* 43, 306-312.

Wagner, G., Hartmann, R. and Oesterhelt, D. (1978) *Eur. J. Biochem.* 89, 169-179.

Wagner, G., Oesterhelt, D., Krippahl, G. and Lanyi, J. K. (1981) *FEBS Lett.* 131, 341-345.

Warburg, O. and Christian, W. (1942) *Biochem. Z.* 310, 384-421.

Warshel, A. (1979) *Photochem. Photobiol.* 30, 285-290.

Weber, H. J. and Bogomolni, R. A. (1981) *Photochem. Photobiol.* 33, 601-608.

Wickner, W. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 1159-1163.

Zadunaisky, J. A. (ed.) *Chloride Transport in Biological Membranes* (1982) Academic Press.

7. ABKÜRZUNGEN

Abs.Max.:	Absorptionsmaximum
app.	apparent
BO:	Bakterioopsin
BR:	Bakteriorhodopsin
BSA:	Rinderserumalbumin
CCCP:	Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon
DA:	dunkeladaptiert
EDTA:	Ethylendiamintetraacetat
FCCP:	Carbonylcyanid-trifluoromethoxyphenylhydrazon
GMF:	Gesamtmembranfraktion
Gua-HCl:	Guadiniumhydrochlorid
HEPES:	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N' -ethansulfonsäure
HPLC:	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
HO:	Haloopsin
HR:	Halorhodopsin
K _m :	Michaelis-Konstante
LA:	lichtadaptiert
Lsm:	Lösungsmittel

Lubrol-PX:	Polyoxyethylenglycol-(9,10)-laurylalkohol
ME:	Mercaptoethanol
MFT:	Tween gewaschene Membran
MG:	Molekulargewicht
MOPS:	3-Morpholinopropansulfonsäure
OD:	optische Dichte
OG:	Octylglycosid = n-Octyl- -D-glucopyranosid
PM:	Purpurnembran
RP:	Umkehrphase (reversed phase)
rpm:	Umdrehungen pro Minute
RT:	Raumtemperatur
SAX:	starker Anionenaustauscher
SDS-PAGE:	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SO:	Slow Opsin
SR:	Slow Rhodopsin
TFA:	Trifluoressigsäure
TPP*:	Tetraphenylphosphonium Kation
TPT:	Triphenylzinn
TTFB:	Tetrachloro-2-trifluoromethylbenzimidazol
Tween 20:	Polyoxyethylenglykol-sorbitolestermonolaureat

$\text{T}\Phi\text{B}^-$: Tetraphenylborat

LEBENS LAUF

Name: Peter Hegemann

geboren: 11. Dez. 1954 in Munster/Westf.

Eltern: Dr. Christel Hegemann
Prof. Dr. Ferdinand Hegemann

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: verheiratet

Schulbildung: 4 Jahre Volksschule
9 Jahre humanistisches Gymnasium

Wehrdienst: 15 Monate

Studium: Chemie/Diplom
5 Semester an der Universität Münster
4 Semester an der Ludwig-Maximilians-Universität München

Diplomarbeit: Diplomarbeit am MPI f. Biochemie
über das Thema: Untersuchungen zur
Funktion der Tyrosine in der Purpur-
membran von Halobakterium Halobium

Seit 1981 Doktorand am MPI f. Biochemie in Martinsried

